

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DU RÉCEPTEUR SCAVENGER DE CLASSE B, TYPE I (SR-BI) DANS
LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME OSSEUX

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
CORINE MARTINEAU

DÉCEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ROLE OF SCAVENGER RECEPTOR CLASS B, TYPE I (SR-BI) IN THE
REGULATION OF BONE METABOLISM

THESIS
PRESENTED
AS PARTIAL REQUIREMENT
FOR THE DOCTORATE OF BIOLOGY

BY
CORINE MARTINEAU

DECEMBER 2014

À mes parents

REMERCIEMENTS

Mes expériences concluantes, mes publications acceptées et ma thèse enfin déposée, je les dois en grande partie à mon directeur de recherche Dr Robert Moreau, ainsi qu'à ma co-directrice Dre Louise Brissette, qui ont su me diriger même dans les périodes les plus difficiles. Sans leur guidance, j'aurais certainement tourné en rond pendant cinq années de plus! Je les remercie infiniment non seulement pour leur support moral, intellectuel et financier (bien sûr!), mais également pour leur patience, leur compréhension et leur temps. Et quand je dis « leur temps », ce n'est pas seulement les heures au travail passées dans leurs bureaux et laboratoires, mais aussi (je dirais même SURTOUT!), les heures de travail qu'ils m'ont consacrées le soir après le travail et les fins de semaine. Merci donc, du fond du cœur.

Il y a deux personnes que je ne pourrais ignorer dans ces remerciements : le Dr Mathieu Brodeur, ancien doctorant chez mes directeurs, et Louise Martin-Falstrault, « l'ange du laboratoire » qui a travaillé de nombreuses années chez Dre Brissette. Je tiens à souligner que les bases de mon projet ont été jetées par Dr Brodeur qui a démontré la présence du fameux SR-BI dans les ostéoblastes. C'est également lui qui a récolté les os ayant servi à mes premières analyses et mené à la découverte du phénotype osseux de nos souris déficientes pour SR-BI. Techniquement, je dois énormément à Mme Martin-Falstrault : elle m'a enseigné tant de méthodes et a toujours fait preuve d'une dévotion et d'une excellence sans pareil au travail. Sans son appui, sa patience et sa gentillesse, les deux premiers chapitres de ma thèse auraient été extrêmement ardues, voire impossible à accomplir.

Il y a bien sûr mes collègues du laboratoire du métabolisme osseux, qui m'ont supportée (dans tous les sens du terme...) pendant mes années parmi eux. J'espère n'oublier personne en mentionnant : Élie Abed, Abdallah Fallah, Véronique Arsenault, Jérôme Lizotte, Olha Kevorkova, Jaime Sanchez-Dardon, Rachel Pierre, Marine Régnier et Céline Signor, toujours prêts pour une petite bière à la moindre victoire. Et n'oublions pas les collaborateurs du laboratoire de Dre Tatiana Scorza (Hugo Roméro, Véronique Gaudreault), de Dr Éric Rassart (Wafa Najyb), de Dre Louise Brissette (Sonia Alem, Ghizlane Gaougaou, François Dallaire, Jade Desjardins), de Dre Diana Averill (Mélanie Grondin) ainsi que toute l'aide technique disponible au département des sciences biologiques de l'UQÀM : Luc Dubé, André Gervais, France Allard, Robert Chalifoux et Denis Flippo.

Un remerciement spécial à mes parents, Alain et Nicole, qui n'ont jamais douté de moi un seul instant, même quand moi-même je n'y croyais plus. Finalement, merci à mon conjoint Ethan, qui a débuté et terminé son doctorat (presque...) en synchronisme avec le mien. Vous êtes les trois personnes les plus importantes dans ma vie.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	XIV
RÉSUMÉ	XXII
ABSTRACT	XXIV
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Le tissu osseux : composantes et fonctions	4
1.1.1 Les composantes inorganiques et protéiques du tissu osseux	4
1.1.2 Les composantes cellulaires de l'os	6
1.1.3 Les fonctions globales du squelette.....	6
1.2 Le modelage/remodelage osseux	7
1.2.1 Les ostéoclastes	8
1.2.2 Les ostéoblastes.....	9
1.2.3 Les ostéocytes	11
1.2.4 Le rôle des OC, OB et OS dans le remodelage	13
1.3 La régulation hormonale du métabolisme osseux	14
1.3.1 L'homéostasie systémique du calcium.....	14
1.3.2 Les stéroïdes sexuels	16
1.3.3 L'axe corticotrope	17
1.3.4 Les cytokines et adipokines.....	19
1.4 Les désordres métaboliques osseux	21
1.4.1 L'ostéoporose et les facteurs de risques associés.....	21

1.4.2	Relation suspectée entre l'athérosclérose et l'ostéoporose	23
1.4.3	Relation entre la masse osseuse et les HDL	25
1.5	Les lipoprotéines.....	25
1.5.1	Les principales classes de lipoprotéines.....	26
1.5.2	Synthèse et modification dans la circulation des lipoprotéines.....	27
1.5.3	Catabolisme des lipoprotéines.....	28
1.5.4	Le récepteur <i>scavenger</i> de classe B, type I	33
1.6	Les radeaux lipidiques	35
1.6.1	Les cavéoles	36
1.6.2	Les récepteurs associés aux cavéoles	37
1.7	Problématiques et objectifs.....	38
CHAPITRE II		
THE ATHEROGENIC <i>SCARB1</i> NULL MOUSE MODEL SHOWS A HIGH		
BONE MASS PHENOTYPE.....		
		41
	Avant-propos.....	42
2.1	Résumé	43
2.2	Abstract.....	44
2.3	Introduction.....	45
2.4	Materials and methods.....	48
2.4.1	Animals.	48
2.4.2	Serology.	48
2.4.3	MicroCT.	49
2.4.4	Static and dynamic histology.	49
2.4.5	Primary cultures of bone marrow stromal cells (MSC).	50
2.4.6	MSC expansion assays.....	51
2.4.7	Proliferation and differentiation assays.....	51
2.4.8	Preparation of lipoproteins	51
2.4.9	Selective uptake assays	52
2.4.10	Real-time PCR	53
2.4.11	Statistical analyses.	54

2.5	Results	55
2.5.1	Cholesterol status of <i>Scarb1</i> null mice.....	55
2.5.2	Bone architecture and histomorphometry	55
2.5.3	Functions of MSC in null mice	56
2.5.4	Impact of high ACTH and high HDL on null MSC.....	57
2.6	Discussion.....	59
2.7	Conclusions	63
2.8	Acknowledgements.....	63
2.9	Figure Legends	67
CHAPITRE III		
GENDER- AND REGION-SPECIFIC ALTERATIONS OF BONE		
METABOLISM IN <i>SCARB1</i> -NULL FEMALE MICE		
		75
	Avant-propos.....	76
3.1	Résumé	77
3.2	Abstract.....	78
3.3	Introduction.....	79
3.4	Material and methods	82
3.4.1	Animals	82
3.4.2	Serology	82
3.4.3	Microcomputed X-ray tomography.....	83
3.4.4	Static and dynamic histology	83
3.4.5	Marrow-derived stromal cultures	84
3.4.6	Osteoblastic differentiation	85
3.4.7	Real-time PCR.....	85
3.4.8	Statistical analyses.....	86
3.5	Results	87
3.5.1	Higher vertebral bone mass in <i>Scarb1</i> -null female mice	87
3.5.2	Enhanced bone formation in vertebrae from <i>Scarb1</i> -null female mice ...	88
3.5.3	Disrupted GC/ACTH and leptin/adiponectin axes in null females	88
3.5.4	<i>In vitro</i> MSC response to leptin and ACTH.....	90

3.6	Discussion.....	91
3.7	Conclusions	96
3.8	Acknowledgements.....	96
3.9	Figure legends.....	100
CHAPITRE IV		
SCAVENGER RECEPTOR CLASS B, TYPE I (<i>SCARB1</i>) DEFICIENCY		
PROMOTES OSTEOBLASTOGENESIS BUT STUNTS TERMINAL		
OSTEOCYTE DIFFERENTIATION		
		108
	Avant-propos.....	109
4.1	Résumé	110
4.2	Abstract.....	111
4.3	Introduction.....	112
4.4	Material and methods	115
	4.4.1 Experimental animals	115
	4.4.2 Culture of bone-marrow stromal cells.....	115
	4.4.3 Preparation of lipoproteins	116
	4.4.4 Association and binding assays.....	116
	4.4.5 MTT activity and proliferation assays	117
	4.4.6 Osteogenic differentiation treatment.....	117
	4.4.7 Osteocyte density	117
	4.4.8 Real-time PCR analysis.....	118
	4.4.9 Statistical analysis	118
4.5	Results	119
	4.5.1 Impact of SR-BI deficiency on HDL ₃ association and binding, and OxLDL cytotoxicity in MSC.....	119
	4.5.2 Contribution of HDL and SR-BI to regulation of MSC proliferation and differentiation	119
	4.5.3 Impact of HDL ₃ on osteogenic markers in WT and <i>Scarb1</i> null MSC..	120
	4.5.4 Enhanced canonical and noncanonical Wnt signaling in <i>Scarb1</i> -null MSC	121
4.6	Discussion.....	122
4.7	Conclusions	127

4.8	Acknowledgements.....	128
4.9	Legend to the figures	130
CHAPITRE V		
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		136
5.1	Récapitulation des altérations du métabolisme osseux chez les souris déficientes pour le récepteur SR-BI.....	137
5.1.1	Altérations du tissu osseux chez les souris déficientes pour <i>Scarb1</i>	138
5.1.2	Perturbation de l'axe glucocorticoïdes/adrénocorticotrophine chez les souris déficientes pour <i>Scarb1</i>	139
5.1.3	Impacts genre-spécifiques de l'ablation de <i>Scarb1</i> et déséquilibre de la leptinémie chez les femelles déficientes pour <i>Scarb1</i>	141
5.1.4	Altérations des fonctions ostéoblastiques des cellules déficientes pour <i>Scarb1</i>	145
5.1.5	Importance relative des effets systémiques et locaux du SR-BI sur la régulation du métabolisme osseux	153
5.1.6	Impact des apolipoprotéines et enzymes associées aux HDL sur le métabolisme osseux.....	154
5.2	Perspectives cliniques.....	156
5.2.1	L'utilisation de <i>Scarb1</i> comme marqueur de risque pour l'ostéoporose	156
5.2.2	Modulation de la masse osseuse <i>via</i> le métabolisme des lipoprotéines .	159
5.3	Conclusions	161
APPENDICE A		
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : ANALYSES MICROCT DES FÉMURS DE SOURIS DÉFICIENTES POUR <i>SCARB1</i> DE 2 À 12 MOIS		162
APPENDICE B		
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : NIVEAUX PLASMATIQUES D'ADIPONECTINE CHEZ LES SOURIS DÉFICIENTES POUR <i>SCARB1</i>		169
APPENDICE C		
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : EFFETS DE L'ACTH ET DE LA LEPTINE SUR LA DISTRIBUTION DE LA CAVÉOLINE-1 DANS LES FRACTIONS RICHES EN CAVÉOLES DES OSTÉOBLASTES		173
APPENDICE D		
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : EXPRESSION DE L'APOLIPOPROTÉINE D DANS LES CELLULES OSTÉOBLASTIQUES		177
RÉFÉRENCES.....		182

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Structure typique d'un os long..... 5
1.2	Cycle du remodelage osseux..... 8
1.3	Diagramme du réseau lacunocanaliculaire. 12
1.4	Diminution de la densité osseuse lors de l'ostéoporose. 22
1.5	Les différentes classes de lipoprotéines..... 27
1.6	Métabolisme des lipoprotéines. 29
1.7	La captation globale <i>versus</i> la captation sélective. 31
1.8	Structure des radeaux lipidiques et des cavéoles. 36
2.1	Plasma cholesterol levels in 2- and 4-month-old WT and <i>Scarb1</i> null male mice..... 69
2.2	Definition of the femoral cancellous and cortical volumes of interest (VOI) from WT and <i>Scarb1</i> null mouse bones. 70
2.3	MicroCT analyses of femoral VOI from 2- to 4-month-old WT and <i>Scarb1</i> null mice. 71
2.4	Histological analysis of mouse femora and plasma levels of CTX. 72
2.5	<i>In vitro</i> characterization of marrow-derived MSCs from WT and <i>Scarb1</i> null male mouse long bones..... 73
2.6	Impact of high ACTH or high HDL ₃ on <i>Scarb1</i> null MSCs. 74
3.1	MicroCT and histological analysis of <i>Scarb1</i> -null mouse vertebrae..... 102
3.2	Plasma cholesterol levels in fasted 2-month-old male and female WT and <i>Scarb1</i> -null mice..... 103
3.3	Serological analysis of the glucocorticoid (GC)/ACTH axis in 2- and 4-month-old WT and <i>Scarb1</i> -null female mice. 104

3.4	Estradiol plasma levels in WT and <i>Scarb1</i> -null mice.....	105
3.5	Plasma levels of leptin and gene expression of <i>Lep</i> in adipose tissue from WT and <i>Scarb1</i> -null mice.....	106
3.6	Response of MSCs from WT and <i>Scarb1</i> -null mice to ACTH and leptin. .	107
4.1	Lack of SR-BI involvement in HDL association/binding and OxLDL-induced cytotoxicity in mouse MSC.....	132
4.2	Effect of HDL on MSC of WT and <i>Scarb1</i> -null mice.....	133
4.3	Expression of osteocytic genes in WT and null cells.	134
4.4	Expression of Wnt signaling pathways in WT and <i>Scarb1</i> -null MSC.	135
5.1	Résumé des effets de la déficience pour <i>Scarb1</i> sur le métabolisme osseux	161
A.1	Analyses microCT des fémurs de souris déficientes pour <i>Scarb1</i> mâles entre les âges de 2 à 12 mois.....	167
A.2	Analyses microCT des fémurs de souris déficientes pour <i>Scarb1</i> femelles entre les âges de 2 à 12 mois.....	168
B.1	Niveaux plasmatiques d'adiponectine chez les souris mâles et femelles déficientes pour <i>Scarb1</i> âgées de 2 et 4 mois.	172
C.1	Effets de l'ACTH et de la leptine sur la distribution de la cavéoline-1 dans les fractions riches en cavéoles des cellules MC3T3-E1.....	176
D.1	Expression et sécrétion de l'apoD dans les cellules MC3T3-E1 au cours d'un traitement ostéogénique.	180
D.2	Expression de l'apoD dans les MSC de souris contrôles et déficientes pour <i>Scarb1</i>	181

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1. Whole body, abdominal fat and epididymal fat pads weight in 2-month-old male mice.	64
2.2. Plasmatic parameters in 2-month-old male mice.	65
2.3. Average dynamic histomorphometric values from femora of WT and null mice.	66
3.1. Plasmatic parameters in fasted 2-month-old female mice.	97
3.2. MicroCT analysis parameter values in 2 and 4-month-old WT and null mice lumbar vertebrae.	98
3.3. Static and dynamic analyses parameter values in 2-month-old WT and null female and male mice vertebrae	99
4.1. Sequences of primers for gene expression	129

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

1,25-(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxyvitamine D ₃
αMEM	<i>Minimal essential medium, alpha modification</i> ; Milieu minimal essentiel, modification alpha
AA	<i>Ascorbic acid</i> ; Acide ascorbique
ABC1	<i>ATP-Binding cassette transporter 1</i> ; Transporteur cassette liant l'ATP 1
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i> ; Transporteur cassette liant l'ATP C1
ABCG5	<i>ATP-binding cassette transporter G5</i> ; Transporteur cassette liant l'ATP G5
AC	Adénylate cyclase
ACAT	Acyl-CoA Cholestérol acyltransférase
ACTH	Adrénocorticotrophine
AdipoR1	<i>Adiponectin Receptor 1</i> ; Récepteur de l'adiponectine 1
AdipoR2	<i>Adiponectin Receptor 2</i> ; Récepteur de l'adiponectine 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i> ; Phosphatase alcaline ALP-l : <i>liver ALP</i> ; ALP du foie ALP-b : <i>bone specific ALP</i> ; ALP spécifique à l'os
AMP	Adénosine monophosphate AMPc : AMP cyclique
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i> ; Protéine kinase activée par l'AMP
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i> ; Virus aviaire de la myéloblastose

APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
Apo	Apolipoprotéine
	ApoA-I/II/IV : Apolipoprotéines A-I, A-II et A-IV
	ApoB-48/100 : Apolipoprotéines B-48 et B-100
	ApoC-I/II/III : Apolipoprotéines CI, CII et CIII
	ApoD : Apolipoprotéine D
	ApoE : Apolipoprotéine E
	ApoH/J/M : Apolipoprotéines atypiques H, J et M
ApoER2	<i>ApoE receptor 2</i> ; Récepteur de l'apoE de type 2
AR	<i>Androgen receptor</i> ; Récepteur androgène
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARS	<i>Alizarin Red S</i> ; Rouge S alizarine
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> ; Collection américaine de cultures types
ATP	Adénosine triphosphate
AvCtTh	<i>Average cortical thickness</i> ; Épaisseur corticale moyenne
AvEsDm	<i>Average endosteal diameter</i> ; Diamètre endostéal moyen
AvPsDm	<i>Average periosteal diameter</i> ; Diamètre périostéal moyen
Axin2	<i>Axis inhibition protein 2</i> ; Protéine d'inhibition de l'axe 2
B2m	Beta-microglobuline
BFR/BS	<i>Bone formation rate per bone surface unit</i> ; Taux de formation osseuse par unité de surface
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> ; Protéine morphogénétique osseuse
	BMP-2 : Protéine morphogénétique osseuse 2
BMD	<i>Bone mineral density</i> ; Densité minérale osseuse
BS	<i>Bone surface</i> ; Surface osseuse
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> ; Albumine de sérum bovin
BV	<i>Bone volume</i> ; Volume osseux
BV/TV	<i>Bone volume per tissue volume</i> ; Volume osseux relatif au volume tissulaire

BRC	<i>Bone remodeling compartment</i> ; Compartiment de remodelage osseux
Cav1	Gène de la cavéoline-1
Cbfb	<i>Core-binding factor beta</i> ; Facteur liant le coeur beta
CcnA2	Cycline A2
CcnD1	Cycline D1
CD36	Récepteur " <i>cluster of differentiation 36</i> "
CD36KO	Souris déficientes en CD36
CE	<i>Cholesterol ester</i> ; Ester de cholestérol
CETP	<i>Cholesterol ester transfer protein</i> ; Protéine de transfert des esters de cholestérol
CIPA	Comité Institutionnel de Protection des Animaux
c-MET	<i>MNNG HOS transforming gene</i>
CO	Cholestéryl oléate
COLI	Collagène de type I <i>Coll1a1</i> : gène du COLI
CT	Calcitonine
CTX	<i>C-terminal crosslinked type I collagen telopeptide</i> ; Telopectide croisé C-terminal du collagène de type I
CRISPR-Cas9	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) protein 9</i> ; Groupe de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées (CRISPR)/Protéine associée à CRISPER (Cas) 9
d	Densité
Dkk1	<i>Dickkopfs-related protein 1</i> ; Protéine de la famille <i>Dickkopfs</i> 1
dL	<i>Calcein double labeling</i> ; Double marquage à la calcéine
DMP1	<i>Dentin matrix protein 1</i> ; Protéine matricielle de la dentine 1 <i>Dmp1</i> : gène de la <i>DMP1</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
Dsh	<i>Disheveled</i>
E ₂	Estradiol
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> ; Acide éthylène tétraacétique

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; Essai immunosorbant couplé à une enzyme
ER	<i>Estrogen receptor</i> ; Récepteur œstrogène α ER : ER de type alpha β ER : ER de type beta
ERE	<i>Estrogen response element</i> ; Élément de réponse aux œstrogènes
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> ; Oxyde-nitrique synthase endothéliale
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> ; Triage cellulaire activé par fluorescence
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> ; Sérum de bovin fœtal
FFA	<i>Free fatty acids</i> ; Acides gras libres
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> ; Facteur de croissance fibroblastique
Fzd/Fz	Récepteurs de la classe <i>Frizzled</i>
G-2-P	Glycérol-2-phosphate
GC	Glucocorticoïdes
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i> ; Récepteur de glucocorticoïdes
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i> ; Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i> ; kinase de la glycogène synthase 3 β
HA	Hydroxyapatite
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> ; Lipoprotéine de haute densité HDL-c : cholestérol associé aux HDL HDL-CE : esters de cholestérol associés aux HDL HDL ₂ : Lipoprotéine de haute densité, fraction 2 HDL ₃ : Lipoprotéine de haute densité, fraction 3
HEK-293T	<i>Human embryonic kidney cells</i> ; Cellules rénales embryonnaires humaines, souche 293T.
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> ; Facteur de croissance hépatique
HL	<i>Hepatic lipase</i> ; Lipase hépatique
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase

Hz	Hétérozygote
IDL	<i>Intermediate-density lipoprotein</i> ; Lipoprotéine de densité intermédiaire
Kd	Constante d'affinité de liaison
LCAT	Lécithine/cholestérol acyltransférase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> ; Lipoprotéine de faible densité LDL-C : cholestérol associé aux LDL
LDLR	<i>Low-density lipoprotein receptor</i> ; Récepteur de lipoprotéines de faible densité
LEF1/TCF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1/Transcription factor</i>
LIMPII	<i>Lysosomal integral membrane protein II</i>
Lp	Lipoprotéine
LPDS	<i>Lipoprotein-deficient serum</i> ; Sérum déficient en lipoprotéines
LPL	Lipoprotéine lipase
LRP	<i>LDLR-related proteins</i> ; Protéines apparentées aux récepteurs LDLR LRP1/5/8 : <i>Lrp1/5/8</i> : Protéine : gène de LRP1, LRP5 et LRP8
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> ; Protéine kinase activée par les mitogènes
MAR	<i>Mineral apposition rate</i> ; Taux d'apposition minérale
MC	Minéralocorticoïdes
MC1R	<i>Melanocortin receptor 1</i> ; Récepteur de la mélanocortine 1
MC2R	<i>Melanocortin receptor 2</i> ; Récepteur de la mélanocortine 2
MEM	<i>Minimal essential medium</i> ; Milieu essentiel minimal
MicroCT	<i>X-ray microcomputed tomography</i> ; Microtomographie à rayons X
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> ; Métalloprotéinase matricielle
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i> ; virus tumoral mammaire murin
MS	<i>Mineralizing surface</i> ; Surface minéralisante
MSC	<i>Mesenchymal stromal cells</i> ; Cellules stromales mésenchymales
MTT	<i>Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> ; Bromure de diméthylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium
MTTi	MTT initial (point de référence expérimental)

NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> ; Facteur nucléaire rehausseur de chaînes légères <i>kappa</i> des cellules B activées
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> ; Oxyde-nitrique synthase
NTX	<i>N-terminal crosslinked type I collagen telopeptide</i> ; Telopectide croisé N-terminal du collagène de type I
O	Ostéon
OB	Ostéoblaste
Ob.S/BS	<i>Osteoblastic surface per bone surface</i> ; Surface ostéoblastique relative à la surface osseuse
ObR _L	<i>Leptin receptor, long form</i> ; Forme longue du récepteur de la leptine
ObR _S	<i>Leptin receptor, short form</i> ; Forme courte du récepteur de la leptine
OC	Ostéoclaste
#OC/mm	Nombre d'ostéoclastes par mm de surface osseuse
OCN	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
OS	Ostéocyte
OSX/Sp7	Ostérix (protéine/gène)
OxLDL	<i>Oxidated low-density lipoprotein</i> ; Lipoprotéine de faible densité oxydée
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ; solution saline tamponnée au phosphate
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Réaction polymérase en chaîne
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> ; Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PF	Paraformaldéhyde
PI	Phosphatidyl inositol
PI3K	Phosphatidylinositide 3 kinase
P1CP	<i>Procollagen type 1 C-terminal peptide</i> ; Peptide C-terminal du procollagène de type 1
P1NP	<i>Procollagen type 1 N-terminal peptide</i> ; Peptide N-terminal du procollagène de type 1
PKA	Protéine kinase A

PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipide
PLC	Phospholipase C
PLTP	<i>Phospholipid transfer protein</i> ; Protéine de transfert des phospholipides
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate
PMMA	Polyméthylméthacrylate
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PPAR α	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i> ; Récepteur proliférateur du peroxisome activé alpha
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i> ; Récepteur proliférateur du peroxisome activé gamma
PTH	<i>Parathyroid hormone</i> ; Hormone parathyroïde
PTHr	<i>Parathyroid hormone receptor</i> ; Récepteur de l'hormone parathyroïde
RANK	<i>Receptor activator of NF-kappaB</i> ; Activateur du récepteur de NF-kappaB
RANKL	<i>Receptor activated NF-kappaB ligand</i> ; Ligand de l'activateur du récepteur de NF-kappaB
RCT	<i>Reverse cholesterol transport</i> ; Transport inverse du cholestérol
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i> ; Famille de gènes homologues à <i>ras</i> , membre A
R _p -cAMPS	<i>R_p-adenosine-3',5'-cyclic monophosphothioate</i> ; Monophosphothioate R _p -adénosine-3',5'-cyclique
Rspo2	R-spondine 2
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i> ; Facteur de transcription de la famille <i>runt</i> 2
Scarb1	<i>Scavenger receptor class B, type I gene</i> ; Gène du récepteur <i>scavenger</i> classe B, type I
Sfrp	<i>Secreted frizzled-related proteins</i> ; Protéines sécrétées similaires à <i>frizzled</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i> ; Petit ARN interférant
sL	<i>Single calcein labeling</i> ; Marquage simple à la calcéine
SOST	Sclérostine

	<i>Sost</i> : gène de la SOST
SR-A	Récepteurs <i>scavenger</i> de classe A
SR-B	Récepteurs <i>scavenger</i> de classe B
SR-BI	Récepteur <i>scavenger</i> classe B type I
SR-BII	Récepteur <i>scavenger</i> classe B type II
SR-BIKO	Souris déficientes en SR-BI
Src	Proto-oncogène <i>sarcoma</i>
SREBP1	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i> ; Protéine liant l'élément régulateur des stérols 1
StAR	<i>Steroid acute regulatory (protein)</i> ; (Protéine) régulatrice aigüe des stéroïdes
STAT	<i>Signal transducers and activator of transcription</i> ; Transducteur et activateur de signal de transcription
Tb.N	<i>Trabecular number</i> ; Nombre de trabécules
Tb.Sp	<i>Trabecular spacing</i> ; Espace trabéculaire
Tb.Th	<i>Trabecular thickness</i> ; Épaisseur trabéculaire
TG	Triglycérides
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i> ; Facteur de croissance transformant β
TRAP-5b	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase, isoform 5b</i> ; Phosphatase acide tartrate-résistante, isoforme 5b
TSP-1	Thrombospondine 1
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> ; Récepteur de la vitamine D
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> ; Facteur de croissance vasculaire endothélial
VK	Coloration de Von Kossa
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> ; Lipoprotéine de très faible densité
VLDLR	<i>Very low density lipoprotein receptor</i> ; Récepteur de lipoprotéines de très faible densité
VOI	<i>Volume of interest</i> ; Volume d'intérêt
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site</i> ; Site d'intégration MMTV de type <i>wingless</i>
	Wnt3a, 5a: Wnt membre 3a ou membre 5a

RÉSUMÉ

Le récepteur *scavenger* de classe B, type I (SR-BI) est un récepteur de lipoprotéines de haute densité (HDL) participant au transport inverse du cholestérol (RCT), un processus l'éliminant par captation sélective à partir des HDL dans le foie. Vu ce rôle, l'ablation du gène du SR-BI (*Scarb1*) réduit les niveaux de RCT et prédispose certains modèles murins à l'athérosclérose. Des études associent l'incidence de cette pathologie à celle de l'ostéoporose, soit un plus haut risque de fractures dû à une faible masse osseuse. Notre équipe a récemment démontré l'expression du SR-BI dans les ostéoblastes (OB), les cellules responsables de la formation osseuse. Ainsi, cette thèse explore l'impact du SR-BI sur la physiologie osseuse.

Le remodelage osseux inclut la formation effectuée par les OB, d'origine mésenchymale, et la résorption faite par les ostéoclastes (OC), d'origine hématopoïétique. Un déséquilibre entre formation et résorption cause des désordres tels que l'ostéoporose. Afin de définir le rôle du SR-BI dans l'os, nous avons étudié l'impact de son absence sur le métabolisme osseux chez la souris. Le premier volet de cette thèse explore le phénotype osseux de souris déficientes pour *Scarb1*; celles-ci présentent une masse et une formation osseuses accrues dans la portion trabéculaire des fémurs. Le potentiel prolifératif et ostéogénique des cellules stromales mésenchymales (MSC) mutantes est rehaussé, un phénotype associé à la sous-expression de cavéoline-1 (*Cav1*) et la surexpression d'ostérix (*Sp7*). Les niveaux d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) circulante sont constitutivement élevés chez les souris mutantes, dû à l'absence d'induction de sécrétion des glucocorticoïdes (GC) en situation de stress. La déficience pour *Scarb1* augmente donc la masse osseuse potentiellement selon deux mécanismes : par des voies systémiques associées à des taux élevés d'ACTH, et par des altérations des fonctions ostéoblastiques des MSC.

Étant donné les différences phénotypiques osseuses entre mâles et femelles, une exploration de l'impact de la déficience pour *Scarb1* sur le dimorphisme sexuel squelettique constitue le second volet de cette étude. Seules les femelles déficientes pour *Scarb1* affichent une masse vertébrale osseuse augmentée; des analyses plasmatiques révèlent des anomalies de l'axe GC/ACTH similaires à celles des mâles. Par ailleurs, aucune différence n'est mesurée quant aux niveaux plasmatiques d'estradiol (E_2) entre les souris mutantes et de type sauvage, excluant ces deux axes hormonaux comme principales causes des altérations des vertèbres particulières aux

femelles déficientes pour *Scarb1*. Cependant, des niveaux plasmatiques de leptine constitutivement élevés chez les femelles mutantes, accompagnés d'une expression accrue de leptine par les adipocytes, expliquent potentiellement les différences liées au genre. Les MSC issues de souris femelles déficientes pour *Scarb1* présentent une altération de l'expression de marqueurs ostéogéniques, tout comme les cellules des mâles. Ces MSC répondent à la leptine et à l'ACTH de façon comparable aux MSC contrôles en termes d'induction génique du *Colla1*. Toutefois, l'expression accrue de *Sp7* et diminuée de la sclérostine (*Sost*) dans les MSC mutantes ne semble plus soumise à la régulation par l'ACTH et la leptine telle qu'observée dans les MSC contrôles. Quoique les altérations cellulaires soient similaires entre les MSC issues de mâles ou de femelles, l'absence du SR-BI génère des différences systémiques spécifiques au genre au niveau de la leptinémie.

Le troisième volet explore les altérations cellulaires des MSC déficientes pour *Scarb1* et l'effet des HDL₃, un ligand sélectif pour le SR-BI. Bien qu'il soit reconnu comme un récepteur de HDL, les niveaux d'association/liaison des HDL₃ et la cytotoxicité induite par les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées (OxLDL) sont comparables entre les MSC mutantes et de type sauvage, suggérant des redondances fonctionnelles par d'autres récepteurs. L'expression de *Scarb1* dans les MSC diminue suite à un traitement ostéogénique. Quoique la déficience pour *Scarb1* engendre une surexpression basale des cyclines, en accord avec un potentiel prolifératif accru, les HDL₃ ne stimulent pas la prolifération des MSC contrôles ni mutantes, et répriment l'expression des marqueurs ostéogéniques. Bien que les MSC mutantes présentent un potentiel accru de différenciation et de minéralisation *in vitro*, l'expression des marqueurs ostéocytaires est diminuée chez ces cellules, ce qui est corroboré par une réduction de la densité des ostéocytes (OS) dans les vertèbres de souris mutantes *in vivo*. Nous avons aussi démontré une surexpression génique de divers intermédiaires des voies Wnt canonique et non-canonique chez les MSC mutantes, suggérant une perturbation de cette signalisation. La perte d'expression du *Scarb1* semble influencer la prolifération et la différenciation des OB en modifiant la signalisation Wnt.

En conclusion, le SR-BI agit sur le métabolisme osseux en régulant divers facteurs systémiques dont certains de manière spécifique au genre, ainsi qu'en modulant l'expression de gènes-clefs dans la prolifération et la différenciation ostéogénique des MSC. Les altérations cellulaires causées par la déficience pour *Scarb1* suggèrent une communication croisée entre le SR-BI et les voies Wnt. Cet aperçu de l'influence du SR-BI sur les axes endocriniens et la signalisation cellulaire régulant la physiologie osseuse ouvre la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques dans le traitement et la prévention de l'ostéoporose.

Mots clefs : SR-BI/*Scarb1*, métabolisme osseux, ostéoblaste, ostéocyte, cavéoline-1, ACTH, glucocorticoïdes, leptine, HDL, prolifération, différenciation ostéogénique, signalisation Wnt.

ABSTRACT

Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is a high-density lipoprotein (HDL) receptor participating in reverse cholesterol transport (RCT), a process eliminating it through its selective uptake from HDL by the liver. In view of this role, genic ablation of SR-BI (*Scarb1*) reduces RCT levels and predisposes some murine models to atherosclerosis. Studies associate this pathology's incidence to that of osteoporosis, defined as a higher fracture risk linked to lower bone mass. Our team recently demonstrated the expression of SR-BI in osteoblasts (OB), the cells responsible for bone formation. Hence, this thesis explores the impact of SR-BI on bone physiology.

Bone remodeling includes formation operated by OB, of mesenchymal origin, and resorption by osteoclasts (OC), of hematopoietic origin. Uncoupling of formation and resorption causes disorders such as osteoporosis. To define the role of SR-BI in bone, we have studied the impact of its absence on bone metabolism in mice. The first part of this thesis explores the bone phenotype of *Scarb1*-deficient mice; the latter show higher bone mass and formation rate within the trabecular portion of femora. The proliferative and osteogenic potential of mutant mesenchymal stromal cells (MSC) is enhanced, a phenotype associated to lower expression of caveolin-1 (*Cav1*) and overexpression of osterix (*Sp7*). Circulating adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels are constitutively high in mutant mice, due to the absence of secretion induction of glucocorticoids (GC) under stress situations. *Scarb1* deficiency therefore potentially augments bone mass through two mechanisms : by systemic alterations associated to high ACTH levels, and by alterations of MSC osteoblastic functions.

Given the bone phenotypic differences between males and females, an exploration of *Scarb1* deficiency's impact on bone sexual dimorphism constitutes the second part of this study. Only *Scarb1*-deficient females show a higher vertebral bone mass; plasma analyses reveal anomalies of the GC/ACTH axis similar to those seen in males. Interestingly, no difference was measured in plasma levels of estradiol (E₂) between mutant and wild-type mice, excluding these two hormonal axes as main causes to the *Scarb1*-deficient female-specific vertebral alterations. However, constitutively high leptin plasma levels in the mutant females, along with its augmented genic expression in adipocytes, potentially explain the gender-related differences. MSC harvested from *Scarb1*-deficient female mice show altered expression of osteogenic markers, as seen in cells from males. These MSC respond to leptin and ACTH similarly to control MSC in terms of genic induction of *Colla1*. However, the higher expression of *Sp7*

and lower expression of sclerostin (*Sost*) in mutant MSC seems no longer regulated by ACTH or leptin as observed in control MSC. Though the cellular alterations are similar between MSC harvested from male and female mice, absence of SR-BI generates gender-specific systemic differences visible through leptin levels.

The third part explores the cellular alterations of *Scarb1*-deficient MSC and the effect of HDL₃, a selective ligand for SR-BI. Even though it is recognized as an HDL receptor, HDL₃ association/binding levels and oxidized low-density lipoprotein (OxLDL)-induced cytotoxicity are comparable between mutant and wild-type MSC, suggesting functional redundancy by other receptors. *Scarb1* expression in MSC diminishes following their osteogenic treatment. Though *Scarb1* deficiency generates a basal overexpression of cyclins, agreeing with the higher proliferative potential, HDL₃ do not promote either control nor mutant MSC proliferation, and repress osteogenic marker expression. Eventhough mutant MSC show greater differentiation and mineralization *in vitro*, osteocyte (OS) markers expression is lower in these cells, being corroborated by a reduction in OS density in vertebrae of mutant mice *in vivo*. We have also demonstrated the genic overexpression of several canonical and noncanonical Wnt pathway intermediates in mutant MSC, suggesting a disruption of this signaling. Loss of *Scarb1* expression seems to influence OB proliferation and differentiation by modifying Wnt signaling.

In conclusion, SR-BI acts on bone metabolism by regulating various systemic factors some of which in a gender-specific manner, as well as through modulation of key-gene expression in MSC proliferation and osteogenic differentiation. Cellular alterations caused by *Scarb1* deficiency suggest a cross-talk between SR-BI and Wnt pathways. This outline of SR-BI's influence on the many endocrine axes and cell signaling regulating bone physiology opens a door towards new therapeutical possibilities in the treatment and prevention of osteoporosis.

Key words : SR-BI/*Scarb1*, bone metabolism, osteoblast, osteocyte, caveolin-1, ACTH, glucocorticoids, leptin, HDL, proliferation, osteogenic differentiation, Wnt signaling.

INTRODUCTION

Cette thèse vise à documenter le rôle du récepteur *scavenger* de classe B, type I (SR-BI) dans le métabolisme osseux. Le SR-BI, le produit du gène *Scarb1*, est un récepteur influençant le métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL). Dans les macrophages, le SR-BI participe à l'efflux du cholestérol cellulaire vers les HDL, contribuant au transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Dans le foie, le SR-BI est associé à des fonctions de captation sélective du cholestérol à partir des HDL d'où il est excrété par les sécrétions biliaires. Bien que l'expression du SR-BI par les cellules assurant la formation osseuse, les ostéoblastes (OB), soit démontrée, son rôle dans le métabolisme osseux demeure inconnu. Le premier chapitre est une revue littéraire des connaissances actuelles sur le métabolisme osseux, le métabolisme des lipoprotéines et des liens potentiels liant ces deux axes physiologiques. Il est suivi d'une brève problématique et des objectifs en découlant.

Le modèle murin déficient pour *Scarb1* a été utilisé afin d'observer l'impact de l'absence du SR-BI sur le métabolisme osseux. Ces souris présentent de hauts taux plasmatiques de cholestérol associé aux HDL, en accord avec son rôle dans le métabolisme de ces lipoprotéines au niveau du foie. Le premier article est une caractérisation du métabolisme et de l'architecture du squelette appendiculaire (fémurs), chez les souris déficientes pour *Scarb1*. Les altérations observées comprennent un taux de formation osseuse accru, des niveaux plasmatiques d'adrénocorticotrophine (ACTH) augmentés, un potentiel de prolifération et de différenciation ostéoblastique des MSC accentué, ainsi qu'une augmentation de l'expression de certains gènes ostéoblastiques dans celles-ci. Cet article est publié dans la revue *AJP-Endocrinology and Metabolism*.

Le second article cible les différences relevées entre mâles et femelles, notamment au niveau du squelette axial (vertèbres lombaires). Afin d'explorer ces différences, le profil hormonal des souris déficientes pour *Scarb1* a été caractérisé au niveau des œstrogènes et des adipokines. Bien que des similitudes soient notées au niveau de l'ACTH plasmatique entre les souris mâles et femelles, la déficience pour *Scarb1* ne perturbe la leptinémie que chez les femelles. Ceci se répercute au niveau de leurs vertèbres où la formation osseuse est augmentée. De plus, des altérations fonctionnelles des MSC observées tant dans les cellules issues de mâles que de femelles démontrent la plus faible expression de marqueurs ostéocytaires, la forme terminale des OB. Cet article est publié dans la revue *Journal of Endocrinology*.

Le troisième article explore les dysfonctions des MSC associées à l'absence du SR-BI et l'effet des HDL₃ utilisés comme ligand sélectif au SR-BI. L'association et la liaison aux HDL₃ sont inchangées en son absence. Les MSC expriment *Scarb1* à la baisse suivant un traitement ostéogénique; son absence cause une surexpression des cyclines A2 et D1, reflétant la prolifération accrue des MSC déficientes. L'exposition aux HDL₃ réprime l'expression des cyclines et de marqueurs ostéoblastiques et ostéocytaires *in vitro* de façon indépendante du SR-BI tant dans les cellules contrôles que déficientes. La contribution des hauts niveaux plasmatiques de HDL chez les souris déficientes pour *Scarb1* à la prolifération accrue des cellules osseuses semble négligeable. Finalement, l'absence du SR-BI altère l'expression de plusieurs acteurs de la voie de signalisation Wnt, expliquant potentiellement les désordres prolifératifs et différenciatifs observés. Cet article est publié dans la revue *Physiological Reports*.

Le dernier chapitre est une discussion générale récapitulant les découvertes globales de cette thèse. Des hypothèses sont également proposées afin de permettre l'exploration d'avenues prometteuses qui pourraient être développées dans une optique appliquée.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le tissu osseux : composantes et fonctions

Le squelette est un organe complexe et dynamique formé de nombreuses sous-unités de formes diverses : les os longs (fémurs), les os plats (calvarium) et les os irréguliers (vertèbres). Ceux-ci sont constitués d'un tissu minéralisé présentant plusieurs niveaux structuraux (Clarke, 2008) (Figure 1.1). Morphologiquement, l'os long présente des épiphyses (à chacune des extrémités) comprenant les plaques de croissances et cernant la diaphyse. Histologiquement, les os se divisent en structures distinctes qui sont le cortex (l'os compact externe) et les trabécules (l'os spongieux interne). Le tissu osseux est majoritairement composé d'une matrice protéique permettant le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite (HA); cette matrice confère aux os à la fois flexibilité, légèreté et solidité (Clarke, 2008). Au cœur de cette matrice se trouvent de nombreux types cellulaires, dont les plus importants sont les ostéoclastes (OC), les ostéoblastes (OB) et les ostéocytes (OS) qui, par le biais d'interactions complexes et orchestrées dans le temps et l'espace, permettent la croissance et le renouvellement constant du tissu osseux.

1.1.1 Les composantes inorganiques et protéiques du tissu osseux

Le tissu osseux comprend 50 à 70% de minéraux, 20 à 40% de matrice organique, 5 à 10% d'eau et moins de 3% de lipides (Clarke, 2008). La matrice organique est composée à 85-90% de protéines collagéniques, principalement le collagène de type 1 (COL1) (Clarke, 2008). Les 10 à 15% restants comprennent les protéines dites non collagéniques, dont l'ostéocalcine (OCN) et la phosphatase alcaline (ALP) sont parmi les plus abondantes (Clarke, 2008). La substance inorganique formant la majeure partie de la matrice osseuse est l'HA, un complexe cristallisé de calcium et de phosphate ($(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$) (Clarke, 2008). La matrice minéralisée comprend également de faibles quantités de magnésium, de sodium, de bicarbonate ainsi qu'une panoplie de métaux à l'état de trace (Clarke, 2008).

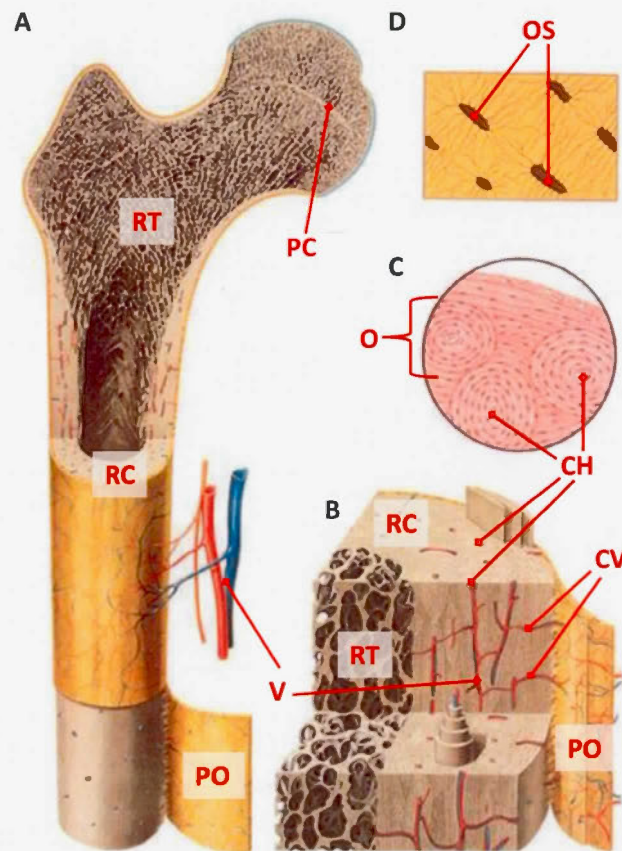


Figure 1.1 Structure typique d'un os long. **A.** Coupe longitudinale de l'épiphyse proximale d'un fémur montrant les régions trabéculaire (RT) et corticale (RC), ainsi que la plaque de croissance (PC). **B.** Détail des RT et RC montrant les canaux de Volkmann (CV), les canaux de Havers (CH) et les vaisseaux sanguins (V), ainsi que le périostéum (PO). **C.** Agrandissement de la RC montrant les ostéons (O). **D.** Agrandissement des O montrant les ostéocytes (OS) les composant. Modifié de www.biovere.com/cart/images/V2050_bone_structure.jpg.

1.1.2 Les composantes cellulaires de l'os

La moelle osseuse renferme plusieurs populations cellulaires provenant de deux lignées : les cellules hématopoïétiques et les cellules mésenchymales (Clarke, 2008; Taichman, 2005). Les cellules provenant de précurseurs hématopoïétiques comprennent les érythrocytes, les lymphocytes, les monocytes, les macrophages et les OC (Taichman, 2005). Les précurseurs mésenchymaux donnent naissance aux adipocytes, aux chondrocytes, aux cellules endothéliales, aux muscles lisses, aux péricytes ainsi qu'aux OB (Conway *et al*, 2001; Taichman, 2005) et aux OS (Franz-Odenaal *et al*, 2006). Les cellules dites osseuses désignent les populations ostéoclastiques, ostéoblastiques et ostéocytaires, responsables respectivement de la résorption et de la formation de la matrice osseuse ainsi qu'assurant l'équilibre entre les deux (Clarke, 2008). Ne formant qu'une infime fraction du volume de l'os, ces cellules sont des composantes métaboliquement actives du tissu osseux essentielles à son renouvellement et ses fonctions dans l'organisme (Clarke, 2008).

1.1.3 Les fonctions globales du squelette

Le squelette donne leur structure et leur forme aux Vertébrés; les os soutiennent et protègent les organes viscéraux et permettent l'attachement des tendons et des muscles nécessaires au mouvement (Clarke, 2008; Kondo *et al*, 2005). Outre ses fonctions mécaniques et neuromotrices, l'os occupe des fonctions vitales au niveau immunologique, la moelle osseuse étant la source des précurseurs hématopoïétiques et immunitaires (Taichman, 2005). De plus, la matrice minéralisée sert de réservoir minéral dans l'homéostasie de l'organisme qui stimule la résorption osseuse pour libérer le calcium (Ca) et autres minéraux lorsque les taux sériques diminuent (Clarke, 2008; Heany et Weaver, 2005).

1.2 Le modelage/remodelage osseux

Le modelage osseux désigne la formation du squelette prenant place lors de la croissance chez les Vertébrés (Clarke, 2008). À l'âge adulte, celui-ci cède la place au remodelage, soit le renouvellement périodique de l'os consistant en une séquence de processus étroitement contrôlée par nombre d'hormones et de facteurs paracrines (Clarke, 2008; Raisz 1999) (Figure 1.2). Le remodelage osseux débute par l'activité des OC résorbant la matrice vieillie ou endommagée, puis des OB synthétisent par la suite une nouvelle matrice (Clarke, 2008). Ces cellules forment une structure temporaire, le compartiment de remodelage osseux (*bone remodeling compartment* : BRC), l'élément sensible aux stimuli subis par l'os. Il se situe entre la matrice et l'espace médullaire. Les BRC sont associés aux vaisseaux médullaires avec lesquels ils communiquent directement (Datta *et al*, 2008; Parfitt, 2001). L'activité des différents BRC est étalée de manière spatio-temporelle; ceux-ci sont sollicités spécifiquement à certains moments et certains endroits en réponse à divers stimuli mécaniques et/ou hormonaux afin de préserver l'intégrité osseuse de façon coordonnée (Datta *et al*, 2008; Parfitt, 2001).

Le remodelage osseux peut être suivi par la présence dans la circulation sanguine et/ou dans les urines des marqueurs du remodelage, soit des protéines/fragments peptidiques associés à l'activité des cellules osseuses (Lenora *et al*, 2009; Singer et Eyre, 2008). Leur taux sérique est proportionnel au taux de remodelage et permet d'estimer les activités des OB et des OC (Singer et Eyre, 2008). Toutefois, l'interprétation de leur variation demeure délicate et dépend du statut hormonal et de l'alimentation des sujets, de la manipulation des échantillons et du cycle circadien (Ivaska *et al*, 2008; Singer et Eyre, 2008). On les classe en 3 catégories : les marqueurs de résorption, les marqueurs de formation et les marqueurs d'interactions des OB-OC (Lenora *et al*, 2009; Singer et Eyre, 2008), décrits plus en détails dans les sections suivantes.

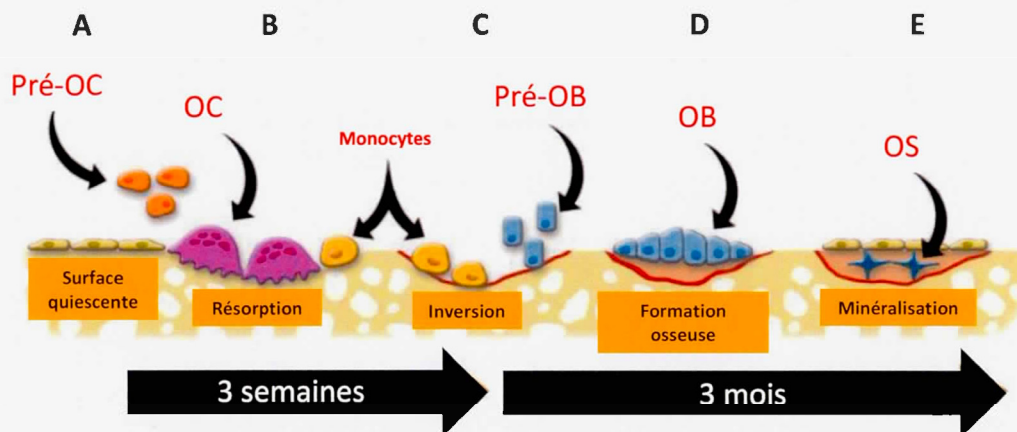


Figure 1.2 Cycle du remodelage osseux. A. Initiation : les pré-OC sont recrutés au site de résorption et fusionnent en OC. B. Résorption : les OC sont activés et creusent une lacune de résorption. C. Inversion : les OC se détachent et les pré-OB sont recrutés au site de résorption. D. Formation : les pré-OB se différencient en OB et sécrètent les protéines matricielles. E. Minéralisation : les OB participent à la minéralisation de la matrice protéique et se différencient en OS. Modifié de www.umich.edu/news/Releases/2005/Feb05/bone.html.

1.2.1 Les ostéoclastes

Les OC sont issus de la lignée des monocytes/macrophages, des cellules positives pour l'antigène de surface CD34 (Väänänen et Laitala-Leinonen, 2008; Väänänen et Zhao, 2008). La fonction primaire des OC est la résorption de la matrice osseuse débutant par l'acidification de la lacune de résorption par l'action de pompes à protons de type V et de canaux chloriques, dissolvant ainsi les cristaux d'HA (Väänänen et Laitala-Leinonen, 2008). La dissolution minérale expose les composants protéiques matriciels qui sont dégradés par des enzymes protéolytiques sécrétées par les OC, telles que les cathepsines lysosomales, les métalloprotéinases matricielles (MMP) et la phosphatase acide tartrate-résistante 5 b (TRAP-5b) (Ljusberg *et al*, 2005; Väänänen et Laitala-Leinonen, 2008). Cette dernière est activée par la cathepsine K et constitue un marqueur de l'activité des OC (Ljusberg *et al*,

2005; Väänänen et Laitala-Leinonen, 2008). Les produits de dégradation de la matrice osseuse traversent la bordure en brosse des OC par endocytose, sont acheminés vers la membrane opposée par transcytose, puis relâchés dans la circulation (Väänänen et Zhao, 2008). À la fin du cycle de résorption, il est supposé que les OC subissent l'apoptose *in vivo* et cèdent la place aux OB qui sécrètent une matrice nouvelle (Väänänen et Zhao, 2008). Les principaux marqueurs sériques de résorption sont la TRAP-5b qui est un indice du nombre d'OC, et les télopeptides croisés C- et N-terminaux (CTX et NTX) générés par divers processus collagénolytiques, considérés comme un index d'activité de résorption (Lenora *et al*, 2009; Singer et Eyre, 2008).

1.2.2 Les ostéoblastes

La moelle osseuse comprend une population de cellules souches mésenchymales (MSC), distincte de la population hématopoïétique donnant naissance aux OC (Clarke, 2008; Taichman, 2005). Les OB proviennent de la différenciation de ces MSC suivant un processus selon lequel ces cellules gagnent en maturité tout en préservant la niche de cellules souches (Canalis, 2003; Clarke, 2008), sous l'influence de facteurs de croissance et d'hormones dont les plus étudiés sont les *bone morphogenetic protein* (BMP) 2 et 7, les *transforming growth factor β* (TGF- β) 1 et 2, ainsi que la parathormone (PTH) et la vitamine D décrites plus loin (Datta *et al*, 2008). Les MSC s'engageant dans cette voie subissent une métamorphose caractérisable dans le temps par le biais de marqueurs, dont les plus utilisés sont l'activité de l'ALP, l'expression et la sécrétion du collagène de type 1 (COL1) et de l'ostéocalcine (OCN) et le potentiel de minéralisation, qui permettent de suivre l'évolution des fonctions ostéoblastiques que sont la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse (Clarke, 2008). Les marqueurs sériques de formation incluent l'ALP osseuse (*bone ALP*, ALP-b) dont la détection englobe celle sécrétée par le foie (*liver ALP*, ALP-l), l'OCN qui peut aussi être libérée suite à la résorption, ainsi que les propeptides N- et C-terminaux du procollagène de type 1 (P1NP et P1CP

respectivement), qui proviennent aussi partiellement de la synthèse de tissus mous tels que la peau (Singer et Eyre, 2008). Les OB jouent également un rôle majeur dans la régulation du processus de résorption. Ces cellules régissent indirectement l'activité de résorption en influençant l'ostéoclastogenèse et l'activité des OC par la sécrétion d'ostéoprotégérine (OPG) et en exprimant le *receptor activator of NFκB ligand* (RANKL) (Clarke, 2008).

Deux facteurs de transcription essentiels au processus de différenciation ostéoblastique sont identifiés : le *runt-related transcription factor 2* (RUNX2), dirigeant les MSC vers un phénotype préostéoblastique, et ostérix (OSX), agissant en aval de RUNX2 et poussant plus avant la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en OB immatures (Komori, 2006). Le RUNX2 forme des hétérodimères avec des protéines co-activatrices dont le *core-binding factor β* (CBFβ), et se lie à l'acide désoxyribonucléique (ADN) grâce à son domaine *runt* (Komori, 2006). À ce stade, les pré-OB peuvent encore se différencier en chondrocytes, un phénomène vital au processus d'ossification endochondrale; d'ailleurs, les souris déficientes en RUNX2 sont complètement dépourvues de tissu osseux (Komori, 2003). L'OSX est un facteur de transcription à doigts de zinc essentiel au développement des OB, tel que démontré par les modèles murins déficients pour *Sp7* (gène codant pour OSX), qui affichent une totale absence d'OB dans un squelette complètement cartilagineux (Komori, 2006). Ces deux facteurs sont spécifiques aux OB et leur niveau d'expression est fréquemment utilisé pour déterminer l'évolution de la différenciation ostéoblastique. Effectivement, le RUNX2 est exprimé très tôt lors de l'engagement des MSC dans la voie préostéoblastique, tandis que le RUNX2 et l'OSX sont exprimés dans les OB immatures (Komori, 2006). Une fois le RUNX2 et l'OSX exprimés par les pré-OB, ceux-ci débutent la sécrétion de collagène et ainsi la synthèse de la matrice osseuse (Maes *et al*, 2010).

Une voie signalétique jouant un rôle majeur dans la formation osseuse est celle des *wingless-type MMTV integration site* (Wnt)/ β -caténine (Boudin *et al*, 2013). Les Wnt sont des glycoprotéines sécrétées riches en cystéines présentes dans de nombreux tissus; elles influencent le développement embryonnaire et post-natal, la polarité cellulaire, l'homéostasie tissulaire ainsi que la prolifération cellulaire (Boudin *et al*, 2013). Dix-neuf Wnt sont répertoriés chez les Mammifères, qui agissent par une interaction directe avec les récepteurs *Frizzled* (Fz), avec ou sans l'intervention de co-récepteurs (Boudin *et al*, 2013). L'activation des récepteurs Fz génère au moins 3 types de réponse cellulaire : la voie canonique (*via* Wnt1, Wnt3a, Wnt8), nécessitant les co-récepteurs *LDLR-related proteins* (LRP) 5 ou 6 qui stabilisent le complexe *glycogen-synthase kinase* (GSK)-3 β /Axin pour mener à l'accumulation cytosolique de β -caténine, ainsi que 2 voies non-canoniques (*via* Wnt5a, Wnt11) activant des intermédiaires autres que la β -caténine et ce, sans l'intervention des LRP (Boudin *et al*, 2013). La voie canonique aboutit ultimement à l'activation de facteurs de transcription de la famille *T cell-specific transcription factor/Lymphoid-enhancer binding factor 1* (Tcf/Lef1) (Boudin *et al*, 2013). Dans les OB, l'activation de cette cascade promeut la prolifération et la différenciation ostéogénique en régulant la transcription de plusieurs gènes tels que *Lef1*, la cycline D1 (*CcnD1*), la sclérostine (*Sost*) et le *Dickkopfs-related protein 1* (*Dkk1*) (Westendorf *et al*, 2004).

1.2.3 Les ostéocytes

Près de 95% des cellules dans la matrice osseuse sont des OS (Franz-Odenaal *et al*, 2006). Ces cellules sont environ 10 fois plus abondantes que les OB dont elles proviennent. Quoique seule une fraction des OB se transforme en OS, la longévité de ces derniers excède de loin celle des OB, atteignant parfois 20 ans chez l'Humain (Frost, 1963), permettant ainsi une accumulation en nombre dans l'os adulte (Franz-Odenaal *et al*, 2006). Lors de la minéralisation, les OB matures sécrètent des protéines matricielles et s'incluent graduellement dans des lacunes; une fraction des

OB ainsi trappés deviennent des OS, caractérisés par des projections cellulaires formant des canalicules à travers l'os (Figure 1.3) (Franz-Odenaal *et al*, 2006). Ceux-ci forment un réseau lacunocanaliculaire complexe à travers la matrice osseuse et leurs extensions permettent une communication avec les OB à la surface osseuse (Komori, 2013). Ce réseau est considéré comme la structure idéale pour transmettre les stimuli mécaniques et hormonaux atteignant l'os et semble responsable de la transduction de ces stimuli en signaux électriques et biochimiques vers les autres cellules osseuses (Komori, 2013). Dû à leur situation au sein d'un réseau tridimensionnel, la physiologie des OS est difficilement observable; les OS immatures sont néanmoins reconnus pour sécréter la sclérostine (SOST) et la protéine matricielle de la dentine 1 (DMP1), deux marqueurs spécifiques aux OS (Franz-Odenaal *et al*, 2006).

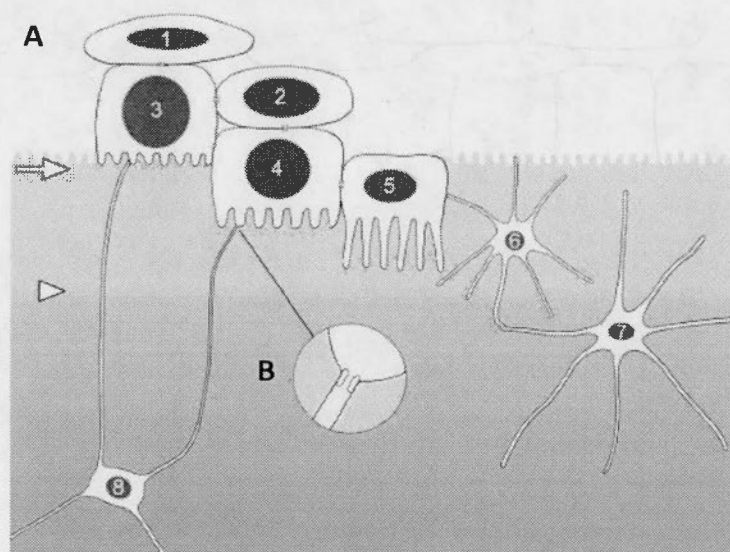


Figure 1.3 Diagramme du réseau lacunocanaliculaire. A. Étapes détaillées de la transformation des OB en OS : (1) pré-OB, (2) OB pré-ostéoblastique, (3) OB mature, (4) OS ostéoblastique, (5) OS ostéoïde, (6) pré-OS, (7) jeune OS, (8) vieil OS. B. Détail d'une jonction entre OS et OB. Tiré de Franz-Odenaal *et al*, 2006.

1.2.4 Le rôle des OC, OB et OS dans le remodelage

L'influence des OB sur la résorption osseuse a été découverte en observant la présence des récepteurs de l'hormone parathyroïdienne (PTH) et de la 1,25-dihydroxyvitamine D3 ($1,25-(OH)_2D_3$) dans les OB et leur absence dans les OC (Lerner, 2004; voir section 1.3.1). De plus, les précurseurs ostéoblastiques expriment le RANKL qui se lie au récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques pour ainsi stimuler leur recrutement, leur différenciation et leur activité (Kearns *et al*, 2008; Lerner, 2004). La sécrétion par les OB matures d'OPG, un récepteur soluble de RANKL, bloque l'interaction de ce dernier avec le RANK et inhibe l'activité ostéoclastique stimulée par les OB immatures (Clarke, 2008; Lerner, 2004). Le ratio des acides ribonucléiques messagers (ARNm) de RANKL/OPG est utilisé comme un indice du stimulus ostéoclastogénique; ce ratio diminue avec la maturation des OB, qui produisent plus d'OPG et inhibent davantage la résorption osseuse. L'expression d'OPG augmente lors de la différenciation des OB, répond peu à la $1,25-(OH)_2D_3$ et est inhibée par la PTH; inversement, l'expression de RANKL demeure stable, mais est induite par la $1,25-(OH)_2D_3$ (Doherty *et al*, 2003; 2004; Kearns *et al*, 2008). De plus, le RANKL possède des propriétés inflammatoires (Teitelbaum, 2006) tandis que la $1,25-(OH)_2D_3$ a plutôt un effet anti-inflammatoire (Kulie *et al*, 2009); ces propriétés sont potentiellement importantes dans le phénomène de la calcification vasculaire, détaillé à la section 1.4.2. Les interactions OB-OC peuvent aussi être mesurées *via* les formes solubles de l'OPG et de RANKL dans la circulation sanguine (Singer et Eyre, 2008).

Plus récemment, il a été démontré que le réseau lacunocanaliculaire des OS joue un rôle capital dans le remodelage osseux. Ces cellules étant encastrées dans la matrice osseuse, leur mort entraîne nécessairement la rupture de leur membrane cytoplasmique libérant ainsi des molécules immunostimulantes à travers les canalicules, notamment le RANKL, provoquant le recrutement et l'activité des OC (Komori, 2013). Les OS influencent également la formation osseuse *via* le facteur

SOST, dont l'abondance est inversement proportionnelle à l'activité ostéoblastique, considérant son rôle d'inhibiteur de la différenciation des OB (Komori, 2013). Il est notamment démontré que la densité des OS et des lacunes augmentent avec l'âge, soulignant l'effet de suppression de la formation osseuse *via* le réseau lacunocanaliculaire (Komori, 2013). De hauts niveaux de SOST peuvent également être associés à une résorption accrue (Komori, 2013). De plus, des modèles murins déficients en SOST démontrent une formation osseuse accrue (Li *et al*, 2008), appuyant le concept que les OS immatures répriment l'activité des OB par l'entremise du facteur SOST.

1.3 La régulation hormonale du métabolisme osseux

Les cellules du tissu osseux répondent à divers facteurs paracrines et autocrines ainsi qu'à de nombreux signaux endocriniens (Clarke, 2008). Plusieurs hormones systémiques influencent le remodelage en régulant les activités ostéoblastiques et ostéoclastiques ainsi que les interactions entre les OB et les OC (Kearns *et al*, 2008; Wang *et al*, 2007a). De plus, les différents axes hormonaux peuvent interagir entre eux, complexifiant davantage la compréhension des réponses métaboliques du squelette face à ces divers stimuli. Dans le cadre de cette étude, seuls quatre principaux axes hormonaux modulant le remodelage osseux sont détaillés, soit les hormones du système homéostatique du calcium (Ca), les stéroïdes sexuels, l'axe corticotrope et les adipokines.

1.3.1 L'homéostasie systémique du calcium

Une méthode de routine pour vérifier l'homéostasie calcique est le dosage du Ca et du phosphate (P) dans le sang ou les urines; des anomalies à ce niveau accompagnent souvent des désordres osseux notamment en lien avec des syndromes rénaux chroniques (Martin et Gonzales, 2007) ou gastrointestinaux (Ezzat et Hamdy, 2010). Deux principales hormones du système homéostatique du Ca peuvent moduler la formation et l'activité des BRC : la PTH et la 1,25-(OH)₂D₃ dont les OB expriment

les récepteurs (Xue *et al*, 2006). Lorsque les niveaux sériques de Ca sont bas, la glande parathyroïde augmente sa sécrétion de PTH. Par le biais de son récepteur (PTHr), la PTH stimule la 1α -hydroxylase au niveau des tubules proximaux rénaux (Xue *et al*, 2006), ce qui favorise l'activation de la vitamine D en $1,25-(OH)_2D_3$. Les OB peuvent également synthétiser et activer la vitamine D indépendamment des mécanismes au niveau des reins (Atkins *et al*, 2007). La $1,25-(OH)_2D_3$ agit par son récepteur nucléaire, le VDR; au niveau systémique, elle augmente la réabsorption rénale de Ca et l'absorption intestinale de Ca et de P (Xue *et al*, 2006). Au niveau de l'os, la $1,25-(OH)_2D_3$ stimule l'expression de RANKL et de l'OCN, inhibant la différenciation des OB immatures et stimulant celle des OB matures (Zhang *et al*, 2011; 2012a). En plus d'être modulée au niveau systémique par les niveaux sériques de Ca, l'expression du VDR est régulée par le facteur de transcription OB-spécifique OSX (Zhang *et al*, 2011; 2012a). De plus, des études démontrent que la $1,25-(OH)_2D_3$ inhibe l'expression du PTHr dans les OB mais pas dans les chondrocytes (Amizuka *et al*, 1999); cette hormone exerce donc un effet spécifique selon le type cellulaire exposé.

Le PTHr est un récepteur de classe II couplé à une protéine G dont l'activation soutenue, notamment par une infusion continue de PTH, stimule la résorption. Cependant, une activation intermittente, telle qu'induite par une série d'administrations ponctuelles de PTH, augmente la formation osseuse (Guo *et al*, 2010). Le PTHr stimule deux voies signalétiques *via* différentes sous-unités de protéines G suite à son activation: la voie de la protéine G_{sa} /adénylyl cyclase (AC)/protéine kinase A (PKA), et la voie de la protéine $G_{q/11}$ /phosphatidyl inositol (PI)/phospholipase C (PLC)/protéine kinase C (PKC) (Guo *et al*, 2010). Ces deux voies sont nécessaires à la fois pour les réponses anaboliques et cataboliques du tissu osseux à la PTH; leur activation intermittente augmente le nombre d'OB, et leur activation soutenue augmente le nombre et l'activité d'OC de façon indirecte à travers la modulation des OB (Guo *et al*, 2010). De plus, l'effet combiné de la PTH et

de la vitamine D augmente la résorption osseuse (Xue *et al*, 2006). En effet, ces deux hormones agissent de concert sur les OB et augmentent l'expression de RANKL et diminuent celle de l'OPG, ce qui explique leur effet pro-résorption (Kearns *et al*, 2008). Une troisième hormone contrecarre l'effet global de la PTH et de la 1,25-(OH)₂D₃ : la calcitonine (CT), un peptide sécrété par les cellules C de la glande thyroïde en réponse à l'hypercalcémie; celle-ci inhibe le recrutement et l'activité des OC en stimulant l'expression de l'OPG et en inhibant celle de RANKL dans les OB (Mancini *et al*, 2007).

1.3.2 Les stéroïdes sexuels

Les œstrogènes jouent un grand rôle dans le métabolisme des os chez la femme, tel qu'illustré par l'ostéoporose induite par la ménopause ou l'ovariectomie (Balasch, 2003; Lerner, 2006). Ces hormones sont aussi vitales dans le système osseux masculin, tel que démontré par des cas cliniques de déficience en aromatase, l'enzyme convertissant la testostérone en estradiol (E₂), dont l'inhibition de la croissance osseuse est rétablie par un traitement aux œstrogènes (Bouillon *et al*, 2004; Vanderschueren *et al*, 2006). Au niveau tissulaire, les œstrogènes maintiennent l'équilibre entre la résorption et la formation; au niveau cellulaire, ces hormones affectent la génération, la durée de vie et l'activité des OB et des OC (Riggs *et al*, 2002). Elles inhibent l'ostéoclastogenèse et sont associées à la synthèse et la sécrétion d'OPG par les OB (Lerner, 2006), ainsi qu'à la fusion de la plaque de croissance des os longs à la fin de la puberté, arrêtant ainsi la croissance longitudinale (Weise *et al*, 2001). Aucune évidence n'existe présentement sur l'impact direct des œstrogènes sur l'expression ou la sécrétion de RANKL; il est cependant admis qu'une hausse de l'OPG influence ce paramètre et que les hormones œstrogéniques ont un effet indirect sur le RANKL (Lerner, 2006). De la même façon, les androgènes tels que la testostérone influencent la densité minérale osseuse, la fusion des plaques de croissance ainsi que la croissance radiale des os chez l'homme (Vanderschueren *et al*, 2004).

Les stéroïdes sexuels agissent sur les fonctions cellulaires par le biais des récepteurs œstrogènes (ER), dont les formes α (α ER) et β (β ER) sont présentes dans les OB, et des récepteurs androgènes (AR) (Krum, 2011; Nilsson *et al*, 2001). Ce sont des récepteurs nucléaires qui agissent en tant que facteurs de transcription activés par leurs ligands (Björnström et Sjöberg, 2005; Krum, 2011). Quoiqu'il soit démontré que les OB répondent aux œstrogènes et aux androgènes, les contributions respectives de ces deux classes d'hormones dans le métabolisme osseux normal demeurent un sujet de débat. Notamment, leurs gènes-cibles spécifiques dans ces cellules sont encore mal connus (Krum, 2011) et de plus, leurs effets varient énormément en fonction de l'âge et du genre des sujets étudiés (Krum, 2011). Ces hormones sont associées à deux grands mécanismes d'action sur les cellules osseuses : (1) un mécanisme dit « génotropique » nécessitant la liaison à un élément de réponse sur l'ADN d'un complexe hormone-récepteur, suivi d'une modulation de la transcription et de la synthèse protéique en réponse au stimulus (Krum, 2011; Windhal *et al*, 2007); (2) un mécanisme dit « non génotropique » déclenchant des cascades signalétiques, notamment des voies *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *phosphatidylinositide 3-kinase* (PI3K) et/ou adénosine monophosphate cyclique (AMPC), et ce rapidement après le stimulus et ne nécessitant pas de synthèse protéique *de novo* (Aguirre *et al*, 2007; Kousteni *et al*, 2002; Krum, 2011; Moriarty *et al*, 2006). Ce second mécanisme suppose l'existence de formes membranaires des ER et des AR se retrouvant dans les cavéoles, des structures de la membrane plasmique dans lesquelles se concentrent de nombreux récepteurs et molécules signalétiques (Schwenke *et al*, 2006). Ces structures sont détaillées plus avant à la section 1.6.

1.3.3 L'axe corticotrope

D'autres hormones stéroïdes influencent le métabolisme osseux de manière significative, telles que les corticostéroïdes. Ceux-ci sont sécrétés par le cortex des glandes surrénales et comprennent les glucocorticoïdes (GC), les minéralocorticoïdes (MC) et les androgènes autres que la testostérone (Gupta et Bhatia, 2008). Leurs

fonctions physiologiques comprennent respectivement le maintien de l'homéostasie, la balance hydrique et électrolytique ainsi que l'apparition de caractères sexuels secondaires (Gupta et Bhatia, 2008). Tous les stéroïdes sont issus du cholestérol; celui-ci est converti en pregnénolone au niveau des mitochondries dans lesquelles il est acheminé par la protéine StAR (pour *steroidogenic acute regulatory*). Dans le cortex surrénal, cette étape est étroitement régulée par l'adrénocorticotrophine (ACTH) (Gupta et Bhatia, 2008). Le récepteur de l'ACTH est le récepteur de la mélanocortine 2 (MC2R), un récepteur membranaire couplé à une protéine G (Winnay et Hammer, 2006); celui-ci est exprimé par les OB (Isales *et al*, 2010). La stimulation du MC2R active la protéine G_s et stimule l'adénylate cyclase (AC), provoquant une production d'AMPc dans la cellule (Böhm et Grassel, 2012). Au niveau des glandes surrénales, l'effet principal de l'activation de MC2R par l'ACTH est la production de corticostéroïdes, ainsi que l'expression de diverses enzymes stéroïdogéniques (Xing *et al*, 2010). De plus, puisque la synthèse de stéroïdes dépend du cholestérol, l'ACTH induit l'expression du récepteur *scavenger* de classe B, type I (SR-BI) responsable de la captation sélective du cholestérol par les surrénales (Sun *et al*, 1999; Xing *et al*, 2010). Au niveau des OB, les gènes-cibles du MC2R sont moins connus; il est cependant démontré que l'ACTH stimule la prolifération ainsi que la synthèse de collagène par ces cellules, probablement selon les mêmes voies signalétiques que dans les glandes surrénales (Isales *et al*, 2010).

Que ce soit dû à un désordre métabolique tel que la maladie de Cushing ou encore suite à une thérapie antiinflammatoire, tout excès de corticostéroïdes dans l'organisme provoque une perte de masse osseuse, potentiellement due à une nécrose vasculaire (Zaidi *et al*, 2010), entraînant l'ostéoporose secondaire (Tauchmanová *et al*, 2001). Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est exprimé par les OB (Rauch *et al*, 2010); il s'agit d'un récepteur nucléaire qui, une fois activé, se dimérise et s'associe à des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) sur l'ADN (Rauch *et al*, 2010). L'impact des GC sur le squelette est intensément étudié, puisque des

variantes synthétiques de ces hormones, telle que la cortisone, sont largement employées dans le traitement de maladies inflammatoires/autoimmunes et dont un effet secondaire important est l'ostéoporose (Brennan-Speranza *et al*, 2012). Les mécanismes de cette ostéoporose secondaire semblent multiples; les GC inhibent l'ostéoblastogénèse et l'activité ostéoblastique et augmentent la longévité des OC, provoquant donc une perte osseuse en diminuant la formation et augmentant la résorption simultanément (Brennan-Speranza *et al*, 2012). Notamment, les GC provoquent l'apoptose des OB et des OS et prolongent la survie des OC, découplant ainsi les processus de formation et de résorption osseuses (Conradie *et al*, 2007). En contrepartie, l'ACTH est reconnue pour stimuler la prolifération des OB ainsi que la synthèse de COL1 par les OB *in vitro* (Isales *et al*, 2010). *In vivo*, l'ACTH semble protéger contre l'ostéonécrose en induisant l'expression du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) favorisant ainsi l'apport vasculaire au tissu osseux (Zaidi *et al*, 2010). L'axe hormonal corticotrope exerce donc un effet à deux niveaux sur le métabolisme osseux : une hausse de la résorption par les corticostéroïdes, mais une hausse de la formation par l'ACTH.

1.3.4 Les cytokines et adipokines

La moelle osseuse jouant un rôle immunitaire prépondérant, une foule de cytokines y est constamment sécrétée dont plusieurs exercent une influence significative sur le métabolisme osseux. L'OPG et le RANKL sont les cytokines les mieux caractérisées au niveau osseux et leur mécanisme est détaillé précédemment (voir section 1.2.2 et 1.2.4). Plus récemment, un groupe de cytokines produites par le tissu adipeux, dites « adipokines », se sont révélées être de puissants modulateurs de la croissance osseuse (Liu *et al*, 2013a). L'adiponectine et la leptine sont les adipokines les plus étudiées. L'adiponectine est une protéine sécrétée par les adipocytes matures qui stimule la différenciation des MSC en OB et module positivement leur prolifération, leur maturation et ainsi la minéralisation du tissu osseux (Liu *et al*, 2013a). De plus, elle stimule la production de l'ALP, de l'OCN et du COL1 par les OB (Liu *et al*, 2013a).

Il existe deux formes du récepteur de l'adiponectine (AdipoR), AdipoR1 et AdipoR2 (Kadowaki et Yamauchi, 2011), toutes deux ayant été détectées dans les cellules ostéoblastiques (Berner *et al*, 2004). Les voies signalétiques stimulées par ces récepteurs comprennent celles des voies calciques, de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) et du *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α), et régulent principalement le métabolisme du glucose et des lipides, ainsi que les voies apoptotiques (Kadowaki et Yamauchi, 2011).

La leptine est un peptide principalement sécrété par le tissu adipeux blanc (Liu *et al*, 2013a). Ses effets sur le métabolisme osseux sont controversés et semblent complexes. D'un côté, des études *in vivo* par Ducy et collègues (2000) démontrent que des injections intracérébroventriculaires diminuent la masse osseuse par le système nerveux sympathique en diminuant les taux de sérotonine. Au contraire, de nombreuses études *in vitro* confirment plutôt une hausse de la prolifération et la différenciation des OB et des chondrocytes; de plus, des expériences *in vivo* confirment une corrélation positive entre l'abondance de la leptine et la régénération osseuse au site de fracture chez le rat (Liu *et al*, 2013a) et le taux de formation osseuse en général (Turner *et al*, 2013). Des études épidémiologiques révèlent également des résultats contradictoires quant à la leptine et au métabolisme osseux (Afghani et Goran, 2009; Ruhl et Everhart, 2002; Weiss *et al*, 2006); de toute évidence, de multiples paramètres à ce jour méconnus influencent la relation entre la leptine et le métabolisme osseux (Liu *et al*, 2013a). Il existe deux variants d'épissage du récepteur de la leptine (OBR), la forme dite « longue » (OBR_L) et la forme dite « courte » (OBR_S), toutes deux codées par le gène DB (Tartaglia, 1997). La forme courte est exprimée ubiquitairement, ne possède pas de domaine signalétique intracellulaire et semble exercer des fonctions de transport ou de clairance de la leptine; la forme longue est exprimée le plus fortement dans l'hypothalamus mais est également détectable quoique faiblement dans divers tissus périphériques (Tartaglia,

1997). Celle-ci est capable d'activer la voie des *signal transducers and activators of transcription* (STAT), y compris dans les OB (Lee *et al*, 2002; Tartaglia, 1997).

1.4 Les désordres métaboliques osseux

Le squelette est un organe dynamique sujet à divers désordres métaboliques; l'ensemble de ces pathologies résulte d'un déséquilibre entre les taux de formation et de résorption osseuses, provoquant un découplage du remodelage osseux et des anomalies squelettiques subséquentes (Manolagas, 2000; Raisz, 2005). Ces physiopathologies sont de natures diverses : lorsque le taux de formation supplante le taux de résorption, il y a une hausse de la masse osseuse menant à l'ostéopétrose ou à la sclérostéose. Ces conditions sont rares et généralement liées à des facteurs génétiques, notamment à des pertes de fonctions de gènes tels que celui de la cathepsine K, inhibant la résorption et causant l'ostéopétrose, ou encore du gène de la SOST, augmentant la formation et provoquant la sclérostéose (Janssens et Van Hul 2002). Lorsque le taux de résorption excède celui de la formation, il y a apparition d'ostéopénie (masse osseuse réduite) ou d'ostéoporose (fragilité osseuse liée à une réduction de la masse osseuse) (Raisz, 2005). L'ostéoporose est un problème de santé majeur, affectant surtout les sociétés industrialisées et particulièrement les personnes âgées, les gens souffrant de malnutrition et les femmes post-ménopausées (Noël *et al* 2004; Staessen *et al* 1999). Outre les fluctuations hormonales observées lors de l'ostéoporose post-ménopausique (Raisz, 2005), les causes sous-jacentes ne sont pas totalement élucidées puisque les facteurs sont multiples et interagissent entre eux. De plus, ce désordre prend souvent source tôt dans la vie mais n'est diagnostiqué qu'à un âge tardif lors de fractures. Toutefois, certains facteurs de risque sont identifiés et permettent une meilleure gestion de cette condition.

1.4.1 L'ostéoporose et les facteurs de risques associés

L'ostéoporose désigne une susceptibilité accrue aux fractures associée à une diminution de la masse osseuse (Figure 1.4). Cette définition décrit un ensemble de

symptômes aux causes multiples, tels l'alimentation, le mode de vie, la génétique ainsi que divers facteurs environnementaux (Sanders *et al*, 2002; Sandhu et Hampson, 2011). L'ostéoporose peut être due à : (i) l'atteinte d'une masse osseuse insuffisante lors de la croissance, (ii) une activité résorptive excessive ou (iii) une formation osseuse inadéquate lors du remodelage (Raisz, 1999). Ce dernier point implique un défaut des fonctions ostéoblastiques attribuable à la sénescence cellulaire, dans le cas de l'ostéoporose associée à l'âge, mais également à une baisse de la synthèse ou de l'activité de facteurs de croissance systémiques ou locaux (Raisz, 1999). Parmi les différents facteurs de risque identifiés, des pathologies systémiques sous-jacentes peuvent nuire au métabolisme osseux normal, telles que le syndrome du côlon irritable (Ezzat et Hamdy, 2010), les désordres rénaux chroniques (Martin et Gonzales, 2007) et les maladies cardiovasculaires (Reyes-Garcia *et al*, 2011).

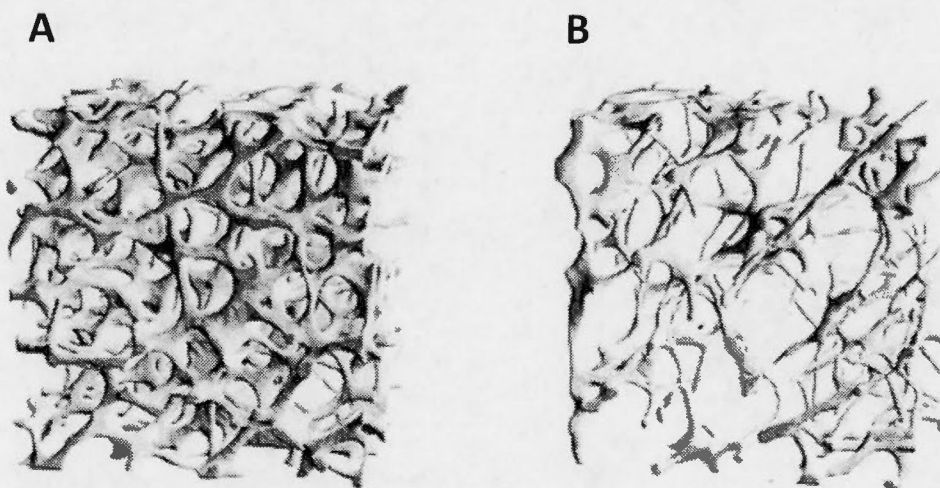


Figure 1.4 Diminution de la densité osseuse lors de l'ostéoporose. Représentation de la portion trabéculaire d'un os sain (A) et d'un os ostéoporotique (B). Tiré de Riggs *et al*, 2002.

1.4.2 Relation suspectée entre l'athérosclérose et l'ostéoporose

Le métabolisme des lipoprotéines ainsi que le niveau de cholestérol plasmatique sont intimement liés à l'athérogenèse, soit le développement de lésions inflammatoires vasculaires, souvent accompagnée du durcissement des parois endothéliales ou « sclérose »; cette pathologie vasculaire se nomme l'athérosclérose (Santamarina-Fojo *et al*, 2004). Il est généralement admis que de hauts niveaux de lipoprotéines de faible densité (LDL) combinés à de faibles niveaux de lipoprotéines de haute densité (HDL) sont des conditions athérogènes. Inversement, de hauts niveaux de HDL accompagnés de faibles niveaux de LDL sont considérés comme un gage de santé cardiovasculaire (Santamarina-Fojo *et al*, 2004). Il est à noter que chez des sujets souffrant de maladies cardiovasculaires, l'apolipoprotéine (apo) A sur les HDL tend à être oxydée par des enzymes circulantes telle que la myélopéroxydase (Zheng *et al*, 2004). Divers facteurs systémiques, tant environnementaux que génétiques, prédisposent au développement de l'athérosclérose, par exemple une alimentation riche en lipides ou des polymorphismes génétiques au niveau des lipoprotéines telles que l'apoE (Yang *et al*, 2001).

De nombreuses données épidémiologiques associent le développement de l'athérosclérose à celui de l'ostéoporose (Farhat et Cauley, 2008). Effectivement, plusieurs études relatent que l'athérosclérose est souvent accompagnée d'une faible densité minérale osseuse, particulièrement au niveau de la hanche et des vertèbres lombaires (Jensky *et al*, 2011). Notamment, les taux circulants de HDL semblent corrélés positivement avec la santé vasculaire ainsi qu'une densité minérale osseuse plus élevée (Ackert-Bicknell, 2012). Au contraire, les LDL peuvent être trappées dans l'espace subendothélial des vaisseaux et subir une oxydation légère par les processus oxydatifs des cellules de la paroi vasculaire (seul le contenu lipidique est altéré) ou une oxydation forte par les monocytes/macrophages recrutés lors de lésions inflammatoires (le contenu lipidique et l'apoB sont altérés) (Berliner *et al*, 1995). Ces LDL oxydées (OxLDL) augmentent la formation de plaques athéromateuses

(Bloodsworth *et al*, 2000). L'athérosclérose s'accompagne ultimement d'une calcification vasculaire poussant la différenciation des cellules vasculaires vers un phénotype « ostéoblastique »; ce processus est induit suite à l'inflammation du vaisseau sanguin affecté et au recrutement de macrophages qui génèrent alors des LDL fortement oxydées (Bloodsworth *et al*, 2000). Cette phase est généralement suivie de la rupture de la plaque athéromateuse et de la thrombose, soit l'occlusion de l'artère affectée (Berliner *et al*, 1995).

La calcification vasculaire et la minéralisation des OB sont deux phénomènes comparables, du moins régulés par les mêmes facteurs : les BMP-2 et BMP-7, le RUNX2, l'OSX, le RANKL et la 1,25-(OH)₂D₃ (Doherty *et al*, 2003; 2004; Johnson *et al*, 2006). De nombreux parallèles existent entre la calcification vasculaire et la formation osseuse, notamment la présence de cellules sécrétant une matrice ultérieurement minéralisée, de cellules capables de résorber celle-ci ainsi que de facteurs paracrines communs (Doherty *et al*, 2003; 2004). Cependant, les déterminants physiologiques menant vers la calcification vasculaire sont encore mal compris et, paradoxalement, les conditions favorisant la différenciation ostéoblastique des cellules vasculaires sont reconnues pour au contraire réduire le potentiel de minéralisation des OB et favoriser plutôt l'adipogenèse (Johnson *et al*, 2006; Parhami *et al*, 1999; 2000). Étant donné leur proximité aux capillaires irrigant les BRC, certaines études démontrent également la sensibilité des OB aux lipides oxydés qui inhibent leur différenciation et leur activité de formation osseuse (Parhami *et al*, 2000; 2001). De plus, les OxLDL provoquent la mort cellulaire des OB, un phénomène contrecarré par les HDL (Brodeur *et al*, 2008a; 2008b). Plusieurs récepteurs de lipoprotéines sont exprimés dans les OB, tels que le récepteur des LDL (LDLR), les LRP (Niemeier *et al*, 2005) et les SR-B (Brodeur *et al*, 2008c). Ces récepteurs sont détaillés plus avant dans la section 1.5.3.1. Puisque de nombreuses études rapportent que les lipoprotéines influencent les OB *in vitro*, les sections

suivantes abordent les caractéristiques des lipoprotéines, leurs fonctions ainsi que les liens entre leur métabolisme et le remodelage osseux.

1.4.3 Relation entre la masse osseuse et les HDL

Il est soupçonné que les lipoprotéines jouent un rôle important dans le métabolisme osseux; notamment, les HDL semblent avoir un impact bénéfique sur la qualité de l'os (Ackert-Bicknell, 2012). Une distinction doit être soulignée entre les niveaux de cholestérol associé aux HDL (HDL-C) et les niveaux de HDL en soit, reflétés par l'abondance de l'apoA; ces deux paramètres n'évoluent pas nécessairement en parallèle (Ackert-Bicknell, 2012). Dans plusieurs modèles murins, par exemple les souris des souches C57BL/6, BTBR et 129SJ, une corrélation positive existe entre les niveaux plasmatiques de HDL et la densité minérale osseuse (BMD) (Ackert-Bicknell, 2012). Cette relation varie sensiblement selon des paramètres tels que la souche, l'âge et l'alimentation (Ackert-Bicknell, 2012). Chez les souris de la souche C57BL/6, la relation entre les niveaux de HDL et la BMD demeure stable peu importe l'âge ou la diète, tandis que ces deux paramètres augmentent avec l'âge chez la souche 129S1, et leurs niveaux de HDL augmentent suivant une diète riche en lipides (Ackert-Bicknell, 2012). De plus, il existe des différences entre les genres quant au métabolisme des lipoprotéines (Brodeur *et al*, 2005; Knopp *et al*, 2005) ainsi qu'osseux (Callewaert *et al*, 2010). Ces différences génétiques et métaboliques sont des facteurs confondant, rendant les études épidémiologiques chez l'Humain plus ardue étant donné le manque de contrôle de variables environnementales et génétiques. Les modèles murins demeurent donc des outils intéressants afin de cerner les déterminants génétiques et environnementaux qui peuvent influencer la relation entre les HDL et la BMD.

1.5 Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des macromolécules sphériques de 10 à 1200 nanomètres (nm) de diamètre, composées d'un cœur de lipides neutres d'esters de cholestérol (CE) et

de triglycérides (TG), dans une capsule amphipathique de phospholipides (PL) et de cholestérol (Willnow *et al*, 2007). Chez les Mammifères, leur capsule contient également des apolipoprotéines déterminant la biologie des lipoprotéines, tels que leur assemblage et mécanisme de sécrétion, l'interaction avec diverses enzymes ainsi que leur affinité pour certains récepteurs (Willnow *et al*, 2007). Leur rôle principal est le transport de lipides structuraux et nutritionnels, ainsi que de divers facteurs et vitamines liposolubles, entre le foie et les tissus périphériques (Fielding *et al*, 1992; Willnow *et al*, 2007).

1.5.1 Les principales classes de lipoprotéines

Les lipoprotéines peuvent être d'origine alimentaire ou endogène. Les premières sont désignées chylomicrons (densité (d) < 0,94 g/mL), et les autres sont classées en quatre groupes selon leur densité (Figure. 1.5) : les lipoprotéines de très faible densité (VLDL, d < 1,006 g/mL), de densité intermédiaire (IDL, d = 1,006 – 1,019 g/mL), de faible densité (LDL, d = 1,019 – 1,063 g/mL) et de haute densité (HDL, d = 1,063 – 1,21 g/mL) (Mahley *et al*, 1984). Les HDL sont subdivisées en HDL₂ (d = 1,063 – 1,125 g/mL) et en HDL₃ (d = 1,125-1,21 g/mL) (Fig. 1.5) (Forti et Diament, 2006). Les classes de lipoprotéines sont également caractérisées par la présence d'apolipoprotéines spécifiques associées à leur enveloppe; les LDL comprennent surtout l'apoB-100, tandis que les HDL contiennent une majorité d'apoA-I et A-II (Hoofnagle et Heinecke, 2009). Le protéome exact caractérisant chaque classe demeure à clarifier dû aux diverses méthodes d'isolation ou de contaminations potentielles (Hoofnagle et Heinecke, 2009). Les différentes apolipoprotéines sont détaillées plus avant à la section 1.5.3.2.

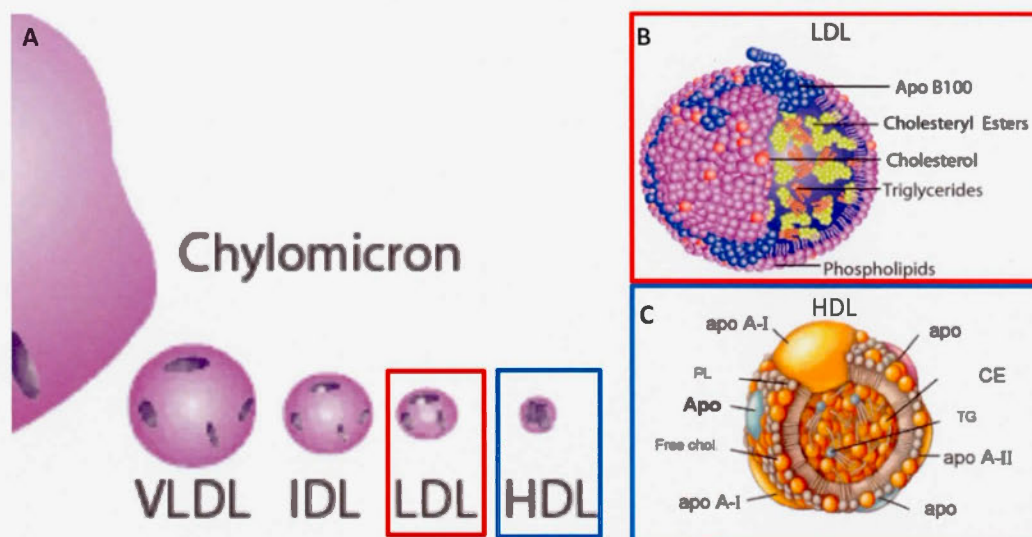


Figure 1.5 Les différentes classes de lipoprotéines. A. Les 5 principales classes de lipoprotéines telles que divisées selon leur densité, dont les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), de faible densité (LDL) et de haute densité (HDL). B. Détail d'une LDL, riche en apoB-100 et en cholestérol. C. Détail d'une HDL, riche en apoA-I et A-II. *Modifié de Biofiles : For life science research*, vol. 2, no. 7, 2007 de Sigma-Aldrich (A et B), et Forti et Diamant, 2006 (C).

1.5.2 Synthèse et modification dans la circulation des lipoprotéines

Les lipoprotéines occupent un rôle central dans le transport des lipides, le métabolisme énergétique et la santé cardiovasculaire (Hoofnagle et Heinecke, 2009). Leur métabolisme débute lors de l'ingestion alimentaire ou de leur synthèse endogène; les chylomicrons, synthétisés par le petit intestin suivant l'ingestion de TG et de cholestérol exogènes, et les VLDL, synthétisées par le foie et transportant les TG et cholestérol d'origine endogène et exogène, sont des particules riches en TG subissant une lipolyse par la lipoprotéine lipase (LPL) associée aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins afin de générer des acides gras nécessaires au métabolisme énergétique (Figure 1.6) (Hegele, 2009; Hoofnagle et Heinecke, 2009). Les VLDL sont métabolisées plus avant par la LPL et la lipase hépatique (HL) en IDL puis en LDL, riches en cholestérol et en CE; l'apoB-100 est l'apolipoprotéine la plus abondante des VLDL et des LDL (Hegele, 2009; Hoofnagle et Heinecke, 2009).

Parallèlement, les apoA-I permettent la formation des HDL à partir des hépatocytes et des entérocytes; celles-ci débutent sous une forme dite discoïdale, avec un pauvre contenu en lipides s'accroissant avec l'efflux de PL et de cholestérol provenant des tissus extrahépatiques par le biais du transporteur *ATP-binding cassette* (ABC) A1 (Hegele, 2009; Hoofnagle et Heinecke, 2009). Une fois chargées en cholestérol et en PL, les HDL discoïdales deviennent des HDL₂ sphériques; ces HDL₂ sont converties en HDL₃ par le transfert de leur contenu lipidique vers d'autres lipoprotéines (Kontush et Chapman, 2006). Plusieurs enzymes permettant l'échange des lipides entre les lipoprotéines font également partie de leur composition, telles que la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) et la lécithine-CoA-acyl transférase (LCAT) (Hoofnagle et Heinecke, 2009). De plus, les lipoprotéines, particulièrement les LDL, peuvent être oxydées dans la circulation sanguine; cette modification survient suite à l'exposition à des radicaux libres ou à des enzymes oxydoréductrices. Un facteur important contrant l'oxydation des LDL est l'activité de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), considérée comme bénéfique à la santé vasculaire (Bloodsworth *et al*, 2000).

1.5.3 Catabolisme des lipoprotéines

Le rôle des lipoprotéines étant d'acheminer les composés hydrophobes dans la circulation entre les tissus périphériques et le foie, celles-ci subissent un catabolisme au niveau cellulaire. Une variété de récepteurs membranaires permet aux cellules d'utiliser les lipoprotéines circulantes selon deux mécanismes : la captation globale et la captation sélective (section 1.5.3.1) (Figure 1.7). Ces voies impliquent la présence de différents récepteurs et structures membranaires, qui dépendent du type cellulaire et de la fonction du tissu (Steinberg, 1996). De plus, elles ne sont pas mutuellement exclusives et coexistent dans la même cellule. Le catabolisme des lipoprotéines est déterminé par les apolipoprotéines de surface (section 1.5.3.2); chacune présente une affinité envers certains récepteurs et lipides, mais servent également de cofacteurs pour les enzymes composant les lipoprotéines (Mahley *et al*, 1984).

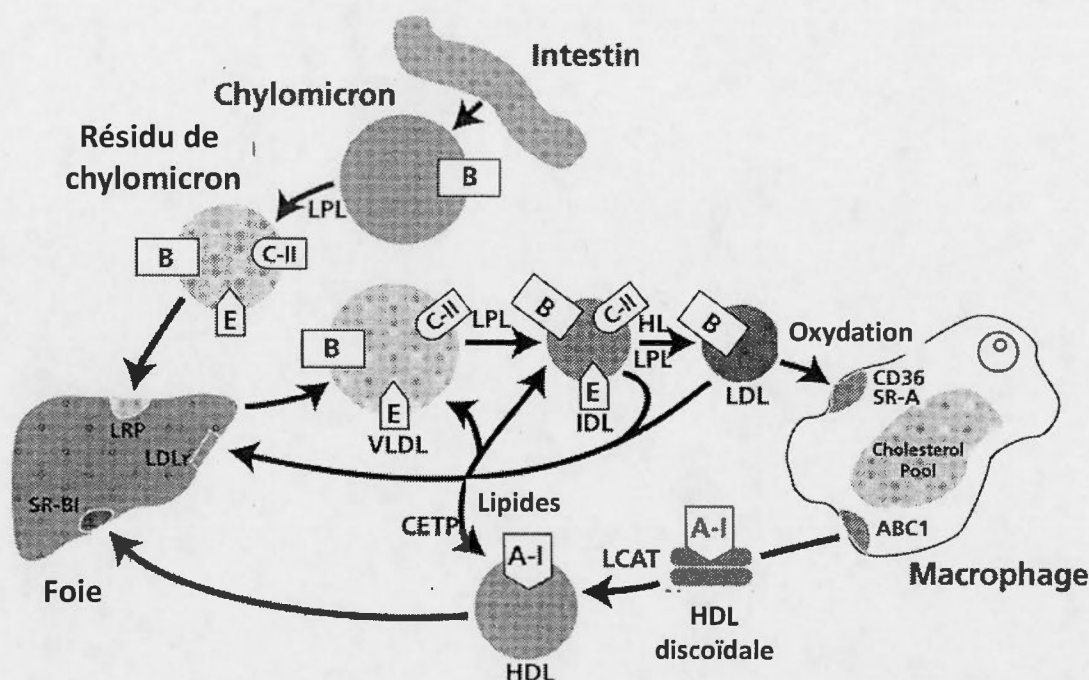


Figure 1.6 Métabolisme des lipoprotéines. Les lipoprotéines de sources alimentaires exogènes (chylomicrons) ou endogènes hépatiques (VLDL, IDL, LDL, HDL) sont liposées par la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hépatique (HL) en résidus de chylomicrons et en LDL, respectivement, libérant les acides gras utilisés dans le métabolisme. Les HDL permettent les échanges lipidiques entre les tissus périphériques et le foie. La LCAT effectue l'estérification du cholestérol et autres composés lipophiles, tandis que la CETP permet l'incorporation de CE dans les différentes lipoprotéines. Les différents récepteurs captent les lipoprotéines selon leurs apolipoprotéines de surface (représentées par les lettres encadrées) : les *LDL-related protein* (LRP) lient généralement les chylomicrons, le *LDL receptor* (LDLR) lie les LDL, le *cluster of differentiation 36* (CD36) et les *scavenger receptor class A* (SR-A) lient surtout les OxLDL, tandis que l'ATP-binding cassette 1 (ABC1) et le SR-BI lient principalement les HDL. Tiré de Kwiterovitch, 2000.

1.5.3.1 La captation globale *versus* la captation sélective

De nombreux récepteurs lient les lipoprotéines pour mener à leur captation globale et leur distribution varie selon les tissus (Charlton-Menys et Durrington, 2006). Il y a le LDLR (Brown et Goldstein, 1979), le récepteur de VLDL (VLDLR) (Takahashi *et al*, 1992), l'alphamicroglobuline (ou LRP1) (Beisiegel *et al*, 1989; Laatsch *et al*, 2012), la mégaline (ou LRP2) (Chen *et al*, 1999) et le récepteur de l'apoE de type 2 (ApoER2, ou LRP8) (Korporaal *et al*, 2004). Une large proportion des LDL est absorbée par les cellules *via* le LDLR par endocytose des puits de clathrine (Kibbey *et al*, 1998). La captation globale est suivie de la dégradation lipolytique et protéolytique des lipoprotéines (Ikonen, 2006) (Figure 1.7A). Ce processus est notamment sollicité dans la captation de la vitamine K à partir des chylomicrons et des lipoprotéines riches en TG par le biais du LRP1; ceci est d'une importance particulière dans les OB puisque ceux-ci et leurs précurseurs nécessitent un apport de vitamine K dans leur physiologie normale (Niemeier *et al*, 2005). Outre leur capacité à capter globalement les LDL, les VLDL et les chylomicrons, ces récepteurs sont impliqués dans l'absorption des métabolites de la vitamine A, D (Willnow *et al*, 1999), K (Niemeier *et al*, 2005) et E (Hall *et al*, 2005) transportés par ces lipoprotéines. L'identité des récepteurs menant au retrait et à la dégradation de la particule HDL est plus obscure; plusieurs candidats sont à l'étude dont la cubiline (Verroust et Kozyraki, 2003), le CD36 (Brundert *et al*, 2011) et la chaîne ectopique beta de l'ATP synthase (Martinez *et al*, 2003).

D'autres récepteurs peuvent soutirer sélectivement les CE des lipoprotéines sans mener à la dégradation complète de la particule. Il s'agit des SR-B, des glycoprotéines membranaires de type III comprenant 2 domaines transmembranaires formant une boucle extracellulaire comportant plusieurs sites de glycosylation (Moore et Freeman, 2006). Cette classe comprend le SR-BI et son variant d'épissage le SR-BII, le CD36 et le *lysosomal integral membrane protein II* (LIMP2); cependant, les mieux caractérisés sont les CD36 et SR-BI (Moore et Freeman, 2006;

Terpstra *et al*, 2000). Le mécanisme précis de la captation sélective, selon lequel les lipoprotéines transfèrent spécifiquement une partie de leur contenu en CE vers la cellule sans dégradation subséquente de leur partie protéique (Steinberg, 1996), demeure ékusif (Figure 1.7B). Il s'agit d'un mécanisme rétroendocytotique dans les cellules hépatiques (Rhainds *et al*, 2004). Dans certains autres types cellulaires, les CE de la lipoprotéine seraient transférés selon un processus passif qui dépend du contenu en cholestérol de la membrane plasmique (Rodriguez *et al*, 1999; Zhang *et al*, 2007). Ce processus est associé aux HDL, mais les CE provenant de LDL peuvent également être captés selon ce mécanisme (Rhainds *et al*, 2004). Dans les OB, il est démontré que cette voie est impliquée dans la captation des CE et de l'E₂ à partir des HDL et des LDL selon un mécanisme dépendant des SR-B (Brodeur *et al*, 2008c).

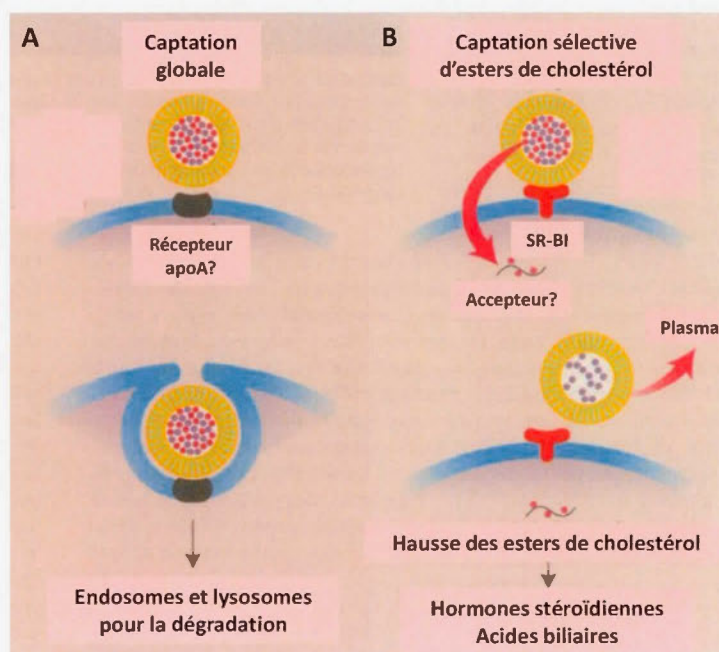


Figure 1.7 La captation globale versus la captation sélective. **A.** La captation globale d'une HDL suivie de la dégradation protéolytique et lipolytique. **B.** Captation sélective à partir d'une HDL via le récepteur SR-BI, suivie de son relargage dans la circulation sanguine. Légende : (●) = esters de cholestérol; (●) = triglycérides. Modifié de Steinberg, 1996.

1.5.3.2 Rôle des apolipoprotéines dans la biologie des lipoprotéines

Il est admis que le principal facteur influençant l'affinité des lipoprotéines pour un récepteur particulier ainsi que leur biologie est la présence d'apolipoprotéines à leur surface. Les HDL peuvent contenir les apoA-I, -II et -IV qui activent la LCAT (I et IV) ou la HL (II), et permettent toutes la liaison au SR-BI; elles peuvent également contenir l'apoD associée à la LCAT, ainsi que l'apoE qui permet la liaison au VLDLR, au LDLR, au SR-BI ainsi qu'à plusieurs LRP (Beisiegel *et al*, 1989; Fotakis *et al*, 2012; Hussain *et al*, 1991; Irshad et Dubey, 2005; Kim *et al*, 1998; Laatsch *et al*, 2012; Out *et al*, 2004). Les apoC-I, C-II et C-III peuvent également se trouver sur les HDL; celles-ci activent la LCAT, activent la LPL ou inhibent la LPL, respectivement (Irshad et Dubey, 2005), tandis que seule l'apoC-III permet la liaison au SR-BI (Out *et al*, 2004). Ces trois dernières apolipoprotéines se retrouvent également dans les VLDL et les chylomicrons (Irshad et Dubey, 2005). Il existe deux formes d'apoB chez les Mammifères; l'apoB-100 lie spécifiquement le LDLR, ainsi que le LRP6 (Ye *et al*, 2012), le LRP8 (Korporaal *et al*, 2004) et le SR-BI (Rhainds *et al*, 2003). En contre-partie, l'apoB-48 ne peut pas lier le LDLR (Higushi *et al*, 1992) mais plutôt le récepteur de l'apoB-48, ApoB48R (Brown *et al*, 2000). Chez l'Humain, l'apoB-48 se retrouve sur les chylomicrons seulement et est sécrétée spécifiquement au niveau intestinal, tandis que la forme apoB-100 est spécifique au foie et se retrouve sur les LDL et les VLDL; dans les modèles murins, la forme tronquée apoB-48 est également sécrétée par le foie et se retrouve donc sur les LDL, les VLDL et les chylomicrons (Farese *et al*, 1996).

Cependant, il ne suffit pas qu'une lipoprotéine porte une apolipoprotéine afin de trancher nettement son devenir métabolique; il existe des interactions entre les différentes apolipoprotéines d'une même lipoprotéine et la proportion de chacune influence grandement leur catabolisme. Par exemple, l'apoC contrecarre la liaison de l'apoE au LRP1 (Kowal *et al*, 1990); une HDL portant plus d'apoE que d'apoC pourra donc lier le LRP1, mais une hausse de la proportion d'apoC l'en empêchera. Il

en va de même pour l'activation de la LPL : une plus grande proportion d'apoC-II maintiendra l'enzyme active, tandis qu'une plus grande part d'apoC-III la maintiendra inactive (Irshad et Dubey, 2005). Les interactions entre toutes les apolipoprotéines et leurs effets spécifiques ne sont pas encore exhaustivement connus; de plus, il existe plusieurs apolipoprotéines dites « mineures » dont les fonctions demeurent nébuleuses. Il en est ainsi pour les apoH, J et M (Irshad et Dubey, 2005). De plus, les apolipoprotéines peuvent être transférées d'une lipoprotéine à l'autre, leur conférant ainsi de nouvelles propriétés et affinité pour différents récepteurs. Ainsi, les HDL₃, pauvres en lipides et en apoE, peuvent accepter les lipides et les apoE des VLDL qui s'en délestent sous l'action lipolytique de la LPL, devenant ainsi des HDL₂ riches en lipides et en apoE (Mahley *et al*, 1984).

1.5.4 Le récepteur *scavenger* de classe B, type I

Le SR-BI, le produit du gène *Scarb1*, est une protéine de 509 acides aminés considérée comme le principal récepteur de HDL avec une constante d'affinité (K_d) inférieure à 10 nM (Rigotti *et al*, 2003). Il se retrouve au niveau du foie, des tissus stéroïdogéniques, et d'une variété de types cellulaires (Rigotti *et al*, 2003; Sun *et al*, 2007) dont les OB (Brodeur *et al*, 2008c). Un modèle murin de la souche C57BL/6 déficient pour *Scarb1* est disponible : celui-ci a été généré en insérant un vecteur Néo au niveau de l'exon 1, empêchant donc l'expression du SR-BI et de son variant d'épissage, le SR-BII (Rigotti *et al*, 1997). Il est à noter que quoique qu'un ARN soit produit, celui-ci n'est pas traduit en protéines (Rigotti *et al*, 1997). Ces souris sont viables, quoiqu'elles présentent une splénomégalie prononcée et que les femelles homozygotes aient une fertilité réduite due à des défauts au niveau de l'implantation des oocytes, qui semblent cependant normaux et en nombre suffisant (Miettinen *et al*, 2001; Rigotti *et al*, 1997). De plus, elles présentent une hypercholestérolémie due à une hausse de la quantité de HDL-C et, de façon moindre, de LDL-C, en accord avec son rôle dans la captation sélective du CE des HDL au niveau hépatique (Trigatti *et al*, 2004). Effectivement, le SR-BI est connu pour participer au transport inverse du

cholestérol (RCT pour *reverse cholesterol transport*), soit le processus selon lequel le cholestérol des tissus périphériques est acheminé vers le foie et subséquemment excrété dans les sécrétions biliaires (van der Velde et Groen, 2005; Zhang *et al*, 2005a). La perturbation de ce processus est reconnue comme un facteur de risque dans le développement de maladies cardiovasculaires (Ohashi *et al*, 2005).

Le SR-BI est aussi une cible du probucol, un agent hypocholestérolémiant augmentant la captation sélective des CE (Rinninger *et al*, 1999). Le probucol restaure également la fertilité des souris femelles déficientes pour *Scarb1* selon un mécanisme encore indéterminé (Miettinen *et al*, 2001). Le SR-BI, potentiellement dû à ses fonctions de captation sélective du cholestérol, est nécessaire à la stabilisation de la cavéoline-1 dont l'expression est étroitement liée à l'homéostasie cellulaire du cholestérol (Frank *et al*, 2002; 2006); cette protéine est décrite à la section 1.6.1. D'ailleurs, les travaux de Truong *et al*. (2006) ont démontré que l'expression de la cavéoline-1 au niveau du foie augmente la capacité du SR-BI de faire la captation sélective de CE des HDL et diminue sa capacité envers les LDL. Le SR-BI se retrouve dans les radeaux lipidiques et/ou les cavéoles, parfois aussi dans les vésicules de clathrine, selon le type cellulaire (Brodeur *et al*, 2008c; Hansen *et al*, 2003; Rhainds *et al*, 2004). Dans les tissus exprimant peu la cavéoline, tel que le foie (Li *et al*, 2001), le SR-BI est localisé au niveau des radeaux lipidiques (Rhainds *et al*, 2004). Dans les tissus exprimant fortement la cavéoline, le SR-BI se situe dans les cavéoles (Babitt *et al*, 1997). Une exception notable est la localisation préférentielle du SR-BI dans les puits de clathrine au niveau de la bordure en brosse des entérocytes duodénaux (Hansen *et al*, 2003). Les OB expriment fortement la cavéoline-1 et conséquemment le SR-BI se retrouve majoritairement dans les cavéoles de ces cellules (Brodeur *et al*, 2008c).

Malgré leur homologie, le CD36 et le SR-BI occupent des fonctions distinctes (Febbraio *et al*, 2001; Sun *et al*, 2007; Terpstra *et al*, 2000); tous deux sont cependant

capables de captation sélective à partir des LDL et des HDL (Truong *et al*, 2006). Le CD36 est une protéine de 471 acides aminés jouant un rôle dans l'immunité innée, le transport d'acides gras et la régulation de l'angiogenèse (Silverstein et Febbraio, 2009). Il est exprimé dans les hépatocytes, les macrophages, les adipocytes, les cellules endothéliales (Terpstra *et al*, 2000) et les OB (Brodeur *et al*, 2008c). Ce récepteur est reconnu pour induire la production de cellules spumeuses, soit des macrophages gorgés de OxLDL participant à la formation des plaques athéromateuses (Febbraio *et al*, 2001; Sun *et al*, 2007). Des ligands endogènes tels que la thrombospondine-1 (TSP-1) et l'acide myristique inhibent par le biais de Src et activent selon un mécanisme dépendant de l'AMPK l'activité de l'eNOS (Isenberg *et al*, 2007; Zhu et Smart, 2005). Les souris déficientes en CD36 sont viables et se reproduisent normalement (Febbraio *et al*, 1998). Cependant, elles présentent de hauts taux sanguins de TG et d'acides gras libres (FFA) (Goudriaan *et al*, 2005), ainsi qu'une baisse de l'incidence de cardiomyopathies liées à l'âge (Koonen *et al*, 2007).

1.6 Les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides dont les fonctions incluent la captation et l'efflux de molécules liposolubles. Une caractéristique de ces microdomaines est leur résistance au détergent Triton X-100 à basse température (Le Lay *et al*, 2009; Nichols, 2003). Quoique leurs rôles varient grandement d'un type cellulaire à l'autre, les radeaux lipidiques occupent une fonction vitale dans diverses voies signalétiques (Pike, 2003), détaillées dans la section 1.6.2. Il existe divers types de radeaux lipidiques se distinguant par la présence de protéines spécifiques, ou encore de différentes proportions des mêmes protéines (Pike, 2003) (Figure 1.8). Ces structures membranaires sont associées à l'efflux et l'incorporation des CE dans plusieurs types cellulaires, ainsi qu'à diverses réponses hormonales (Razani *et al*, 2002; Pike, 2003).

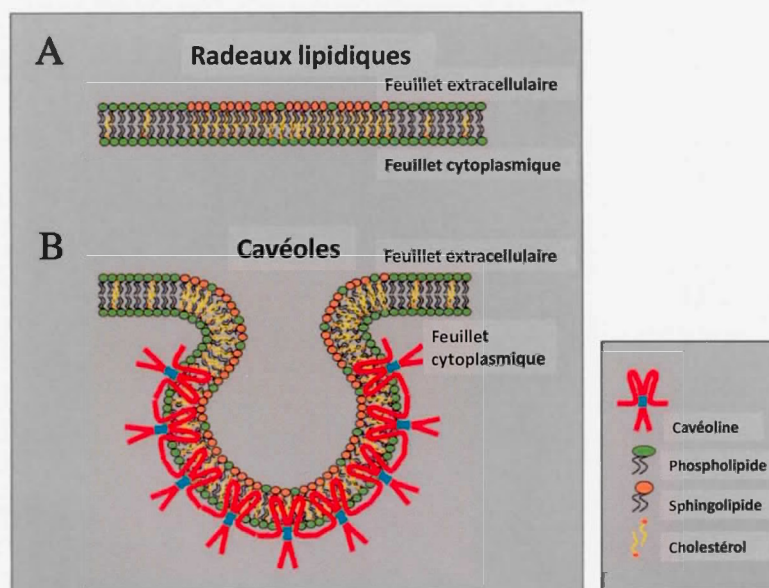


Figure 1.8 Structure des radeaux lipidiques et des cavéoles. **A.** Radeaux lipidiques, riches en sphingolipides mais dépourvus de cavéoline. **B.** Cavéoles, riches en sphingolipides et en cavéoline-1, lui donnant sa structure typique en forme de flasque. Modifié de Razani *et al*, 2002.

1.6.1 Les cavéoles

Les cavéoles sont une sous-classe de radeaux lipidiques dont la seule distinction pratique est la présence de la cavéoline (Nichols, 2003; Pike, 2003) (Fig. 1.8B). Ce sont des invaginations membranaires de 50 à 100 nm de diamètre dans lesquelles les récepteurs SR-BI (Frank *et al*, 2006; Goligorsky *et al*, 2002; Yuhanna *et al*, 2001) et CD36 (Cohen *et al*, 2004; Goligorsky *et al*, 2002; Pilch *et al*, 2007) sont souvent localisés. Ces structures occupent des fonctions dans le transport vésiculaire ainsi que l'homéostasie cellulaire du cholestérol, notamment en permettant le transport du cholestérol du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique, en facilitant son efflux vers le milieu extracellulaire ainsi que sa captation à partir des lipoprotéines (Razani *et al*, 2002). La présence de cavéoles et l'expression de la cavéoline-1 sont liées à la disponibilité du cholestérol (Frank *et al*, 2006). La formation des cavéoles dépend de l'expression de la cavéoline-1, ayant une forte

affinité pour le cholestérol (Frank *et al*, 2006). Les cavéolines comprennent trois membres, les cavéolines-1, -2 et -3, provenant de trois gènes distincts. Les cavéolines-1 et 2 sont exprimées dans tous les tissus sauf les muscles squelettiques et cardiaque, dans lesquels seule la cavéoline-3 est détectable (Cohen *et al*, 2004). La cavéoline-1 est une protéine de 178 acides aminés et de 22-24kDa dont l'expression est nécessaire et suffisante pour générer des cavéoles (Cohen *et al*, 2004). Cette protéine forme des oligomères allant jusqu'à 400 kDa et ne présente aucun segment extracellulaire; sa structure comprend un domaine d'oligomérisation, un domaine transmembranaire, deux domaines liant diverses protéines, trois sites de palmytoylation (Cohen *et al*, 2004) ainsi qu'un site de phosphorylation sur le résidu tyrosine 14 (Vihanto *et al*, 2006).

1.6.2 Les récepteurs associés aux cavéoles

Plusieurs voies signalétiques sont associées aux cavéoles, qui forment des complexes dits « signalosomes » avec diverses protéines intracellulaires (Cohen *et al*, 2004; Razani *et al*, 2002). De nombreuses études démontrent que les cavéolines interagissent avec diverses molécules signalétiques *in vitro*, telles que les sous-unités G_{α} , les MAPK, des Src tyrosine kinases, l'eNOS, la PKC alpha (PKCa) et la petite protéine G RhoA (Cohen *et al*, 2004; Liu *et al*, 2002; Somara *et al*, 2007). Tel que mentionné précédemment, les cavéoles recrutent de nombreux récepteurs dont l'ER (Zhang *et al*, 2005b), l'AR (Bennett *et al*, 2009), le récepteur de l'insuline (Smith *et al*, 1998), le CD36 et le SR-BI (Brodeur *et al*, 2008c). Ces deux derniers récepteurs, ainsi que plusieurs autres, peuvent être palmitoylés et myristoylés sur certains résidus cystéine et glycine respectivement (Babitt *et al*, 1997; Ott *et al*, 2014); la fonction de ces modifications post-traductionnelles demeure obscure mais influence possiblement leur distribution membranaire, notamment au sein des cavéoles, ainsi que leurs interactions avec les autres protéines des signalosomes (Babitt *et al*, 1997; Resh, 1999; Rigotti *et al*, 2003).

La cavéoline-1 maintient certaines de ces molécules signalétiques inactives jusqu'au stimulus approprié, ou au contraire permet leur activité. Dans le cas des SR-B, cette relation n'est pas bien définie. Les cavéoles sont abondantes dans les OB normaux (Cantiani *et al*, 2007); de plus, dans les cellules d'ostéosarcome, la perte de l'expression de la cavéoline-1 provoque une hyperactivation soutenue des Src et du récepteur tyrosine kinase du *hepatocyte growth factor* (HGF, c-Met), ce qui augmente leur potentiel prolifératif et métastatique (Cantiani *et al*, 2007). Dans certains modèles cellulaires, la cavéoline-1 est reconnu pour réprimer la transcription de la cycline D1 (Hulit *et al*, 2000) et ainsi de conserver les cellules dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire (Galbiati *et al*, 2001).

1.7 Problématiques et objectifs

Le SR-BI occupe des fonctions essentielles dans le métabolisme des lipoprotéines et la synthèse des hormones stéroïdes. Ce récepteur est cependant exprimé dans divers tissus périphériques, dans lesquels son rôle demeure peu documenté. Des travaux antérieurs de notre équipe (Brodeur *et al*, 2008c) démontrent que le SR-BI est exprimé dans les OB dans lesquels il semble principalement localisé au niveau des cavéoles. Cependant, aucune fonction cellulaire claire n'est attribuée au SR-BI dans ces cellules. Il importe donc de définir son rôle dans l'os, puisque l'influence du cholestérol et des lipoprotéines dans la physiologie et la pathophysiologie du remodelage osseux devient de plus en plus évidente.

Le SR-BI effectue le RCT par ses fonctions de captation sélective des CE des HDL et les achemine des tissus périphériques vers le foie pour leur excrétion biliaire. Ainsi, le SR-BI contribue au métabolisme des HDL. Puisque des études suggèrent que les HDL exercent un rôle bénéfique sur l'os, il est possible de croire que l'absence de SR-BI se traduirait par une modification de l'architecture osseuse telle que l'ostéopénie, mettant ainsi en lumière son rôle dans le métabolisme osseux.

Un dimorphisme sexuel existe dans le métabolisme des lipoprotéines; chez la souris, le SR-BI est exprimé plus faiblement dans le foie des femelles et son expression est diminuée par les œstrogènes. De plus, puisqu'il contribue à l'approvisionnement des tissus stéroïdogéniques en cholestérol, il est plausible que son absence se traduise par des modifications différentes entre les genres et que ces modifications soient en lien avec une altération des niveaux de corticostérone et d'œstrogènes circulants. Par ailleurs, le tissu adipeux exprime fortement le SR-BI, et ce tissu occupe des fonctions endocrines telles que la sécrétion d'adiponectine et de leptine. De plus, des différences sont connues au niveau du métabolisme adipeux entre mâles et femelles. Nous postulons que l'absence de SR-BI pourrait se traduire par des altérations du métabolisme du tissu adipeux, et qu'elles soient plus marquées chez les femelles.

Dans plusieurs modèles cellulaires, il semble y avoir une relation régulatrice et fonctionnelle entre le SR-BI et la cavéoline-1. De plus, cette dernière est fortement exprimée dans les OB et est reconnue pour influencer le cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation. Considérant les travaux de Frank *et al* (2002) montrant que l'expression de SR-BI favorise l'expression de la cavéoline-1, l'absence du SR-BI pourrait donc influencer l'expression de la cavéoline-1 dans les OB et ainsi se traduire par une réduction du nombre de cavéoles, perturbant ainsi les fonctions ostéoblastiques. Par ailleurs, considérant que le SR-BI est reconnu comme étant un récepteur de HDL, l'absence de ce récepteur pourrait se traduire par une réponse déficiente des OB aux effets des HDL.

Afin de déterminer le rôle de SR-BI dans la régulation du métabolisme osseux, nous avons utilisé le modèle murin déficient en *Scarb1* afin de caractériser l'architecture et le métabolisme osseux chez ces souris. En se basant sur les connaissances acquises sur le SR-BI au niveau d'autres tissus, nos travaux se sont divisés en trois volets : la caractérisation du phénotype osseux chez la souris déficiente en *Scarb1*, l'exploration

des altérations spécifiques au genre et, finalement, les altérations au niveau cellulaire causées par la déficience en *Scarb1*.

Chacun des volets est exploré dans les chapitres suivants, sous forme d'articles scientifiques. La première étude a évalué principalement le phénotype du squelette appendiculaire chez les souris mâles et femelles déficientes en *Scarb1*, notamment en lien avec les axes endocriniens des corticostéroïdes et de l'ACTH.

Au fil de cette étude, il est devenu clair que notre hypothèse voulant qu'il y ait une différence entre les souris mâles et les femelles déficientes pour SR-BI se vérifiait; le second article se voulait une exploration des différences spécifiquement liées au genre, notamment au niveau du squelette axial. Ainsi, les particularités des femelles aux niveaux architectural et sérologique ont été documentées dans ce modèle.

Finalement, le troisième volet est une analyse plus poussée des mécanismes affectés dans les cellules ostéoblastiques, communs aux cellules issues de la moelle osseuse des mâles ou des femelles. Notamment, l'influence du SR-BI sur la liaison et l'association des MSC aux HDL ainsi que sur l'impact des HDL sur la prolifération et l'expression de marqueurs ostéoblastiques de ces cellules ont été explorés afin de cerner des mécanismes potentiellement importants dans la régulation du métabolisme osseux au niveau cellulaire.

CHAPITRE II

THE ATHEROGENIC *SCARB1* NULL MOUSE MODEL SHOWS A HIGH BONE MASS PHENOTYPE

Corine Martineau¹, Louise Martin-Falstrault², Louise Brissette², Robert Moreau^{1*}

1. Laboratoire du métabolisme osseux, BioMed, UQÀM

2. Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines, BioMed, UQÀM

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal
Montréal, Qc, Canada, H3C 3P8

AJP-Endocrinology and Metabolism, 306: E48–E57

Avant-propos

Le thème exploité dans cet article visait à répondre à la première hypothèse de cette thèse, soit de démontrer que les souris déficientes pour *Scarb1* présentent une propension au développement de l'ostéoporose. Au contraire, l'absence du SR-BI provoque plutôt une augmentation de la masse osseuse malgré une susceptibilité accrue à l'athérosclérose, un désordre vasculaire dont l'incidence coïncide avec celle de l'ostéoporose. Au fil de mes recherches, il est devenu apparent que les désordres hormonaux causés par l'absence de ce récepteur, soit l'incapacité de produire des pics de corticostérone suivant un stress accompagnée de hauts taux circulants d'ACTH, expliquaient en partie le phénotype observé. En plus de ces anomalies systémiques, des défauts au niveau des OB eux-mêmes ont été relevés, tels qu'une prolifération et une différenciation accrues *in vitro*, ainsi que la surexpression du facteur de transcription ostérix et la sous-expression de la cavéoline-1. Les résultats présentés dans cet article comparent la structure fémorale entre souris mâles et souris femelles, mais seuls la sérologie et les cultures primaires issues des mâles y sont exploitées. Quoique les femelles affichent également une masse osseuse augmentée, celles-ci présentent des anomalies endocrines et du squelette axial absentes chez les mâles. Ces particularités ont d'ailleurs été exploitées dans le second article (voir chap. III).

La récolte des échantillons osseux et sériques a été effectuée par moi-même et Louise Martin-Falstrault; toutes les expériences et les analyses subséquentes ont été effectuées par moi-même. La rédaction de l'article et l'interprétation des résultats ont été faites par Robert Moreau, Louise Brissette et moi-même, ainsi que les révisions du manuscrit final. Cet article est publié dans la revue *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, ayant un facteur d'impact de 4.088 en 2014.

2.1 Résumé

Le récepteur scavenger de classe B, type I (SR-BI), le produit du gène *Scarb1*, est un récepteur associé avec la captation sélective d'ester de cholestérol partir des lipoprotéines de haute densité (HDL), orchestrant le mouvement du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son excrétion et conséquemment, les souris déficientes pour *Scarb1* sont sujettes au développement de l'athérosclérose. Puisque des études relèvent certains liens entre l'incidence de l'athérosclérose avec celle de l'ostéoporose, nous avons caractérisé le métabolisme osseux chez ces souris. La morphométrie osseuse a été observée par microtomographie à rayons X assistée par ordinateur (microCT) et par histologie. Les cellules stromales issues de la moelle osseuse (MSC) ont été utilisées afin de caractériser l'influence du SR-BI endogène dans les fonctions cellulaires. Les taux de cholestérol total et associé aux HDL dans les souris déficientes sont augmentés de 32 à 60 %, corrélant avec son rôle dans le métabolisme des lipoprotéines. Les métaphyses distales de souris mutantes de 2 et 4 mois montrent respectivement 46 % et 37 % d'augmentation de la fraction volumique osseuse, associée à un nombre accru de trabécules. Les analyses histomorphométriques chez les souris déficientes mâles de 2 mois révèlent une surface ostéoblastique augmentée 1.42 fois, un pourcentage de surface minéralisante 1.37 fois plus élevé, et un taux de formation osseuse rehaussé de 1.69 fois. Des essais *in vitro* sur des MSC isolées de la moelle de souris déficientes pour *Scarb1* révèlent un taux de prolifération 37 % plus élevé, 48 % plus d'activité de l'ALP, un potentiel de minéralisation 70 % plus élevé et une expression de ostérix (*Sp7*) 2 fois plus forte, mais une baisse de 0.5 fois dans l'expression de la cavéoline-1 (*Cav1*). Les niveaux de la captation sélective du cholestéryl oléate et de l'estradiol associés aux HDL étaient similaires entre le MSC isolées de souris contrôles (WT) ou déficientes pour *Scarb1*, suggérant que sa contribution à ce processus n'est pas son rôle principal dans ces cellules. Cependant, l'ablation de *Scarb1* abolit la régulation dépendante des HDL de l'expression de *Cav1*. Les souris déficientes pour *Scarb1* ne sont pas prédisposées à l'ostéoporose mais présentent une masse osseuse plus élevée associée à une augmentation de la formation osseuse.

2.2 Abstract

Scavenger receptor class B, type I (SR-BI), the *Scarb1* gene product, is a receptor associated with cholesteryl ester uptake from high-density lipoproteins (HDL), which drives cholesterol movement from peripheral tissues towards the liver for excretion and consequently, *Scarb1* null mice are prone to atherosclerosis. Since studies have linked atherosclerosis incidence with that of osteoporosis, we characterized the bone metabolism in these mice. Bone morphometry was assessed through microcomputed tomography (microCT) and histology. Marrow stromal cells (MSC) were used to characterize influence of endogenous SR-BI in cell functions. Total and HDL-associated cholesterol in null mice were increased by 32 to 60 %, correlating with its role in lipoprotein metabolism. Distal metaphyses from 2 and 4-month-old null mice showed correspondingly 46 % and 37 % higher bone volume fraction associated to higher number of trabeculae. Histomorphometric analyses in 2-month-old null male mice revealed 1.42-fold greater osteoblast surface, 1.37-fold higher percent mineralizing surface, and 1.69-fold enhanced bone formation rate. *In vitro* assays for MSC from null mice revealed 37 % higher proliferation rate, 48 % more ALP activity, 70 % greater mineralization potential and a 2-fold osterix (*Sp7*) expression, yet a 0.5-fold decrease in caveolin-1 (*Cav1*) expression. Selective uptake levels of HDL-associated cholesteryl oleate and estradiol were similar between MSC from wild-type (WT) and *Scarb1* null mice, suggesting that its contribution to this process is not its main role in these cells. However, *Scarb1* knockout stunted the HDL-dependent regulation of *Cav1* genic expression. *Scarb1* null mice are not prone to osteoporosis but show higher bone mass associated with enhanced bone formation.

2.3 Introduction

Osteoporosis is of growing concern as aging of populations occurs; it is a bone disorder resulting from an imbalance in skeletal remodeling, defined by lower bone mass and higher bone fragility (Sandhu and Hampson, 2011). It is considered a silent, multifactorial health issue with significant morbidity and social cost (Weston *et al*, 2011). Several genetic, nutritional, behavioral and environmental parameters have been identified as risk factors, each contributing to a small fraction of total incidence (O'Neill, 2005; Sanders *et al*, 2002; Sandhu and Hampson, 2011). Well documented pathophysiological cues include loss of gonadal function (e.g. menopause) (Ahlborg *et al*, 2003), hyperparathyroidism (Bilezikian *et al*, 2005), alterations of intestinal (Katz et Weinerman, 2010) and renal functions (Cunningham *et al*, 2004), and medical treatments such as long-term use of glucocorticoids (Canalis *et al*, 2007). Though several of these pathologies are classically considered to be a side effect of systemic mechanisms, some direct bone alterations have been reported, such as inhibition of osteoblastogenesis, osteoblastic activity and osteoclastic activity (Crockett *et al*, 2011; Raisz, 1999). Likely most of these skeletal disorders result from the sum of systemic and bone-specific alterations.

Epidemiologic studies have linked atherosclerosis incidence with the development of osteoporosis (Farhat and Cauley, 2008; Jensky *et al*, 2011), and a growing body of biological and genetic evidence argues for a common etiology in both conditions (Bostrom *et al*, 2011). A recurrent factor in most of these studies is high circulating cholesterol levels, and lipid lowering agents such as statins have been shown to reduce atherosclerotic lesions as well as osteoporosis (Parhami *et al*, 2000). Accordingly, most epidemiological investigations show a positive correlation between high-density lipoproteins (HDL) and bone mineral density (Ackert-Bicknell, 2012). In fact, HDL are greatly responsible for the removal of cholesterol from peripheral tissues, a process termed reverse cholesterol transport (RCT) (van der

Velde and Groen, 2005). The disruption of RCT in macrophages is central to the onset of atherosclerotic plaque (Ohashi *et al*, 2005). Its inhibition promotes the differentiation of macrophages to foam cells, which accumulate oxidized lipids and cause the appearance of arterial wall lesions (Ji *et al*, 2011; Shashkin *et al*, 2005).

Scavenger receptor class B, type I (SR-BI), the product of the *Scarb1* gene, is a glycosylated cell surface receptor highly expressed in steroidogenic organs and liver (Acton *et al*, 1996). This receptor binds HDL with high affinity (Acton *et al*, 1996). In order to study the role of this receptor in HDL metabolism, Rigotti *et al* (1997) generated *Scarb1* null mice. These mice show significantly higher serum cholesterol, especially HDL-associated, and a propensity to develop atherosclerosis (Huby *et al*, 2006). SR-BI is considered the main physiological receptor for HDL that mediates bi-directional flux of cholesterol and other lipids between HDL and cells (Mineo and Shaul, 2012). SR-BI allows cholesterol efflux from cells and thereby, contributes to the RCT from peripheral tissues towards the liver for excretion (Zhang *et al*, 2005a). Moreover, SR-BI participates in the selective uptake of cholesteryl esters (CE) from HDL in the liver and steroidogenic tissues (Brundert *et al*, 2005; Hoekstra *et al*, 2009). In accordance HDL-CE selective uptake is greatly reduced in *Scarb1*-null mice (Brodeur *et al*, 2005). Therefore, studies attribute an atheroprotective role to SR-BI by contributing to HDL-mediated RCT. Of interest, high HDL serum levels are generally correlated with lower incidence of both osteoporosis and atherosclerosis and have been proposed as linking factor between the two conditions (Ackert-Bicknell, 2012).

Scarb1 null male mice have been reported to exhibit defective glucocorticoid synthesis due to lack of SR-BI-mediated cholesterol uptake in the adrenal glands; this condition was accompanied by high ACTH levels (Hoekstra *et al*, 2008; 2009). Since ACTH is now considered a modulator of osteoblastogenesis, *Scarb1* knockout may impact bone metabolism through systemic mechanisms involving this axis (Isales *et*

al, 2010; Zaidi *et al*, 2010). Moreover, previous work has shown that SR-BI is expressed in osteoblast-like cell lines and primary osteoblast (OB) cultures, more specifically in caveolae-rich membrane structures (Brodeur *et al*, 2008c). We have reported selective uptake of HDL-associated cholesteryl ester and estradiol by bone-forming OB (Brodeur *et al*, 2008c). Though the identity of the involved receptor and the relevance of this process in OB remain to be determined, *Scarb1* null OB and OB precursors could also display dysfunctions altering bone growth.

Thus, the *Scarb1* null mouse may prove to be a useful model in studying the role of SR-BI in bone metabolism, as well as understanding the relation between osteoporosis and atherosclerosis. The present work therefore aimed at assessing the bone phenotype in *Scarb1* null mice.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Animals.

Scarb1 null mice on a C57BL6/129 background (stock #003379) were purchased from Jackson laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and cross-bred with WT C57BL/6 mice. Heterozygous (HZ) littermates (initial parental couples, P0) were intercrossed to yield first generation (F1) wild-type (WT), HZ and null mouse pairs; since null dams show low fertility, higher reproduction rates were achieved by feeding them a 0.5% probucol diet (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) 10 days prior to mating (Miettinen *et al*, 2001). Untreated HZ dams were mated in parallel to allow direct WT and null littermate comparison, as well as confirm that the probucol treatment did not affect the observed phenotype. Null mice of F7 to F10 generations from both HZ and null pairs were pooled (40 % and 60 % proportion, respectively) in age groups ranging from 2 to 4 months, according to assay, and compared to age-matched WT groups. All individuals were kept in a 12 h/12 h day/night cycle with free access to food and water unless specified otherwise. All animal protocols were performed according to the UQÀM Institutional Animal Care Committee (IACC 611). Following euthanasia, whole body, abdominal fat and epididymal fat pads were weighed. Due to significant differences in their hormonal profile and axial skeleton, some results for females are detailed elsewhere.

2.4.2 Serology.

Whole blood was harvested from 2-month-old and 4-month-old mice through cardiac punctures and collected in 3mL heparinated tubes (68 USP, BD Bioscience, Mississauga, Ont., Canada). Plasma was obtained by centrifugation at 2000 *g* for 25 min at 4 °C and stored at -80 °C until analyses. Calcium, phosphate and glucose were evaluated by QuantiChrom assays (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), and alkaline phosphatase (ALP) and total/lipoprotein-associated cholesterol were quantified using EnzyChrom assays (BioAssay Systems). Briefly, plasma was

incubated with p-nitrophenylphosphate for ALP activity or EnzyChrom enzyme mix (for total cholesterol) at room temperature. VLDL/LDL and HDL-associated cholesterol fractions were separated by PEG-precipitation of plasma samples and the enzyme mix was added to the pellets (for VLDL/LDL) and supernatants (for HDL). ACTH (MyBioSource, San Diego, CA, USA), corticosterone (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) and C-telopeptide of type I collagen (CTX; R&D Systems, Burlington, Ont. Canada) were measured with ELISA kits according to manufacturers' protocols.

2.4.3 MicroCT.

Following CO₂ euthanasia, bones were harvested and fixed in 4 % paraformaldehyde-phosphate buffered saline (PF) at 4 °C for 16-20 h. Samples were scanned with a Skyscan 1172c system (Soquelec, Montreal, Que., Canada) at a 5 µm image pixel size, 70 kV, 100 µA, 1200 ms exposure. Raw images were reconstructed with the NRecon software (Skyscan, Aartselar, Belgium); trabecular and cortical volumes of interest (VOI) were defined, modeled and analyzed with the CTAn software (Skyscan). The selected trabecular VOI consisted of a 2 mm metaphyseal segment 0.5 mm below the growth plate reference point; the cortical VOI were a 0.5 mm diaphyseal segment selected 2.5 mm below the growth plate reference point. The bone mineral density (BMD) was estimated using hydroxyapatite phantoms scanned under similar experimental conditions.

2.4.4 Static and dynamic histology.

Twenty mg of calcein (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Canada) per kg body weight were injected intraperitoneally in 2-month-old mice on days 10 and 2 prior to euthanasia (day 0). PF-fixed undecalcified bones were embedded in low-temperature polymerizing polymethylmethacrylate (PMMA) as previously described (Erben, 1997), sectioned at 6 µm with a Thermofisher rotary HM 360 microtome and used for Von Kossa, ALP (Millipore, Billerica, MA, USA) and tartrate resistant acid

phosphatase (TRAP) (K Assay, Dako, Burlington, Ont., Canada) histochemical stainings. VK, ALP or TRAP-stained bone sections were visualized with an inverted phase contrast microscope (TE-300, Nikon, Mississauga, Ont, Canada) and used to evaluate relative OB surface (Ob.S/BS) and number of osteoclasts (#Oc/mm). Double calcein labeling was visualized with a Nikon FN1 Eclipse inverted fluorescence microscope and used to evaluate mineralizing surface (MS/BS), mineral apposition rate (MAR) and bone formation rate (BFR/BS). For each randomly numbered sample, 3 to 5 sections were analyzed with the ImageJ software (NIH, USA). MS/BS was evaluated with the following formula: $(dL + sL/2)/BS$, where dL and sL are the double- and single-labeled bone surfaces, and BS is the whole bone surface from the analyzed area. MAR was measured as the average distance between calcein fronts in double-labeled bone surfaces divided by the time span between injections (8 days); BFR/BS was calculated by multiplying MAR and MS/BS.

2.4.5 Primary cultures of bone marrow stromal cells (MSC).

Long bones from 2 to 4 month-old mice hind limbs were harvested and sterilized in PBS containing 200 U/ml penicillin-200 µg/ml streptomycin and 1 % FungiZone (all from Invitrogen, Burlington, Ont., Canada). Epiphyses were cut off under sterile hood and marrow was flushed out. Marrow was suspended in αMEM culture medium supplemented with 100U/ml penicillin-100 µg/ml streptomycin, L-glutamine, 10 % fetal bovine serum (North Bio, Toronto, Ontario, Canada), 25 µg/mL L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich) and plated in 100 mm culture dish; bones from 1 mouse were used per dish, unless otherwise specified. The cells were left to adhere for 7 days, and thoroughly washed with PBS to eliminate non adherent cells. Adherent cells were left to reach confluence prior to harvest and experimentation; adherent MSC phenotype was assessed in subsequent experiments.

2.4.6 MSC expansion assays.

Bone marrow was suspended in α MEM with 10 % FBS and marrow cells were plated at either 1 000 000 or 2 000 000 cells/cm², and left to adhere for 24 h. Adherent cells were thoroughly washed with PBS and left to grow for 10 days; the cells were then trypsinized, suspended in PBS and counted with a haemocytometer.

2.4.7 Proliferation and differentiation assays.

Long bone-derived MSC were harvested at confluence with 0.5 % trypsin-0.1 % EDTA (Invitrogen) and plated in 24-well plates at a density of 50 000 cells per cm² for differentiation assays. Once confluence was reached (day 0), cells were cultured in MEM containing non-essential amino acids (NEAA) and 10 % FBS, supplemented (osteogenic) or not (control) with 50 μ g/mL ascorbic acid and 5 mM β -glycerophosphate (both from Sigma-Aldrich) 3 times a week for 21 days. Differentiation was evaluated on days 0 and 21 through cellular ALP activity (as described in Moreau *et al*, 1997) and Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) staining, solubilisation and spectrophotometric reading. For proliferation assays, cells were plated in 96-well plates at a 20 000 cells per cm² and viability was evaluated 24 h later (day 0) as well as on days 1, 3, 5, 7 and 10, through tetrazolium microtiter (MTT) assay (Sigma-Aldrich). For experiments with ACTH, cells were cultured in medium containing 2 % FBS with or without 10 nM ACTH (Tocris Bioscience, Bristol, UK). The resulting formazan crystals, indicative of cell metabolic activity, were solubilized in DMSO and the absorbance was read at 570 nm with a microplate reader (Tecan, Männedorf, Austria). Proliferation was expressed as a ratio of metabolic activity of a given time-point normalized to initial metabolic activity on day 0 (MTTi).

2.4.8 Preparation of lipoproteins

Lipoproteins were isolated from human plasma (Bioreclamation, Hicksville, NY, USA). Before isolation, the plasma was supplemented with 0.01 % EDTA, 0.02 %

sodium azide, and 10 μ M phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) to prevent degradation. Human HDL₃ (density 1.125–1.21 g/ml) were prepared by ultracentrifugation as described previously (Brissette *et al*, 1996; Brodeur *et al*, 2008c). HDL₃ were iodinated by a modification (Langer *et al*, 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1958) as previously reported (Brodeur *et al*, 2008c). Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25, followed by dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific radioactivity ranged from 98,000 to 277,750 cpm/ μ g protein. HDL₃ were labeled with 1,2-[³H]cholesteryl oleate (CO) following established procedures (Roberts *et al*, 1985). The labeled lipoproteins were then reisolated by ultracentrifugation. The specific activity of HDL₃ labeled with CO ranged from 11,200 to 17,900 cpm/ μ g protein. For the labeling of HDL₃ with estradiol, [2,4,6,7,16,17-³H]estradiol (E₂) (87 Ci/mmol) in 0.5 M HEPES buffer (pH 7.4) was added to 1.5 mg of HDL₃ diluted in 1 ml of TBS and incubated under agitation and nitrogen for 24 h. Labeled lipoproteins were reisolated by ultracentrifugation, and the specific activity ranged from 3,300 to 5,500 cpm/ μ g protein.

2.4.9 Selective uptake assays

Cellular associations of ¹²⁵I-lipoprotein or [³H]CO- or [³H]E₂-HDL₃ (20 μ g of protein/ml) were measured at 37 °C for 4 h on confluent cellular monolayers in 12-well plates (Sarstedt) in α MEM supplemented with 1 % bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) as previously described (Brodeur *et al*, 2008c). Non-specific association was assessed by the addition of 1.5 mg of protein/ml of unlabeled lipoproteins. At the end of the incubation, cells were washed twice with 1 ml PBS containing 0.2 % BSA, followed by two washes with 1 ml PBS, and solubilized in 1.5 ml of 0.2 N NaOH. Radioactivity counts in the homogenates were obtained with a cobra II γ -counter (Canberra-Packard) for ¹²⁵I-HDL₃ determination and with a β -counter (Wallack-Fisher) for measurement of [³H]CO- or [³H]E₂-HDL₃ content. The results are expressed in micrograms of lipoprotein protein per milligram of cellular

protein. Cellular protein contents were determined by the Bradford method (1976). To compare the association of lipoproteins labeled in protein (^{125}I) or in CO/ E_2 (^3H), the association data of [^3H]CO- or [^3H] E_2 -HDL₃ were estimated as micrograms of protein per milligram of cell protein (apparent uptake). To achieve this, the specific activity of [^3H]-HDL₃ was expressed in counts per minute per microgram of lipoprotein protein. The specific association was calculated by subtracting the nonspecific association from the total association. Selective uptake of CO or E_2 is observed when specific [^3H]CO- or [^3H] E_2 -HDL₃ association minus specific ^{125}I -HDL₃ association is greater than zero.

2.4.10 Real-time PCR

First passage MSC monolayers were cultured in α MEM containing 10 % FBS to observe osteogenic marker expression at confluence, or for 24 h in MEM containing 2 % lipoprotein-deficient serum (LPDS) with or without 150 μg of HDL₃ for observation of *Cav1* expression. Total RNA from MSC was extracted using RiboZol (Amresco, Solon, OH, USA) following manufacturer's instructions. One μg of RNA was reversed transcribed with AMV reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Laval, Que., Canada) and the resulting cDNA was used for PCR on a MyiQ thermal cycler (BioRad, Mississauga, Ont., Canada) using SYBR Green (BioRad). Primers specific for β -microglobulin (*B2m*) (F: 5'-TACTCACGCCACCCACCGGAG-3', R: 5'-GCTCGGCCATACTGGCATGCT-3'), collagen type 1 alpha 1 (*Colla1*) (F: 5'-ACTTCAGCTTCCTGCCTCAG-3', R: 5'-GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC-3'), caveolin-1 (*Cav1*) (F: 5'-AGGTGACTGAGAAGCAAGTGTATG-3', R: 5'-CAAAGTCAATCTTGACCACGTC-3') and osterix (*Sp7*) (F: 5'-TTCGCATCTGAAAGCCCACT-3', R: 5'-TGCGCTGATGTTTGCTCAAG-3') were used, and the PCR were run for 40 cycles with an annealing temperature of 58 °C for 30 sec. The expression of each gene was normalized to gene expression of *B2m*, and then expressed as a null to WT ratio. The relative fluorescence units (RFU) were analyzed with the iQ5 software (BioRad).

2.4.11 Statistical analyses.

Statistical analyses were conducted with the Prism5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Paired t tests, ANOVAs and Bonferroni post hoc tests, as indicated in the legend, were applied to determine statistical significance; a P value of 0.05 was considered as the significance threshold. All data are presented as mean \pm SEM.

2.5 Results

2.5.1 Cholesterol status of *Scarb1* null mice

Since epidemiologic studies have linked atherosclerosis incidence with the development of osteoporosis, we took advantage of the availability of the atherogenic *Scarb1* null mouse model to investigate the role of SR-BI in bone metabolism. First, we determined general morphogenic and plasmatic parameters of these null mice. Despite a trend towards an increase, no significant difference was observed in total body nor abdominal fat weight between 2-month-old WT and null male mice (Table 2.1), with similar results up to 12 months of age and for female mice (data not shown). To assess whether *Scarb1* knockout caused any metabolic or mineral disorder, plasmatic levels of calcium, phosphate, ALP and glucose were measured in 2-month-old WT and null male individuals; no significant alterations were detected under these conditions (Table 2.2) and similar results were obtained for female mice (data not shown). Since these null mice were reported to have a propensity to develop atherosclerosis (Huby *et al*, 2006; Rigotti *et al*, 1997), we measured their cholesterol plasma profile. As expected, total plasma cholesterol and HDL-associated fractions were respectively increased by 32-46 % and 50-60 % in 2- and 4-month-old *Scarb1* null mice compared to WT mice (Fig. 2.1); a similar profile was observed in females (data not shown).

2.5.2 Bone architecture and histomorphometry

We next investigated whether *Scarb1* knockout was associated with alterations of bone architecture. The visual appreciations (Fig. 2.2) clearly show the observed architectural alterations, particularly pronounced at a younger age (2-month-old (A) and 4-month-old (B) individual depicted); no difference was observed in bone mineral density (BMD) for *Scarb1* null male mice whereas higher BMD was measured in *Scarb1* null female mice at 2-month-old (data below Figure 2.2). MicroCT analyses (Fig. 2.3) indicated that younger null male mice showed

significantly higher relative trabecular bone volume (BV/TV), with a 46 % increase in 2-month-olds, as well as a 37 % increase in 4-month-olds, respectively (Fig. 2.3A, left up panel). This higher bone volume was reflected by greater number of trabeculae per mm (Fig. 2.3A right up panel) and smaller distance from trabecula to trabecula (data not shown). Trabecular thickness remained unaffected under these conditions (Fig. 2.3A down panel). Similar trabecular alterations were observed in *Scarb1* null females (Fig. 2.3A). No significant alterations were observed for cortical bone in *Scarb1* null males whereas cortical volume was significantly higher in 2-month-old females (Fig. 2.3B). Analysis of bone tissue sections corroborates the microCT findings (Fig. 2.4); Von Kossa (VK) staining of mineralized bone area was increased in femora sections from null mice compared to WT mice (Fig. 2.4A, upper panels). Moreover, higher ALP positive cell surface was observed in bone tissue of null mice (Fig. 2.4A, middle panels and Table 2.3). No significant difference was noted in the number of TRAP positive cells (Fig. 2.4A, lower panels and Table 2.3). Figure 2.4B shows representative interlabel distances in trabecular (TB) and cortical regions (CT); null mice displayed accentuated trabecular mineral apposition rate (mean 1.27 fold), as the cortical mineral apposition rate only showed a slight increase (non-significant) in male and a significant increase (1.67 fold) in *Scarb1* null female mice (Table 2.3). These values were accompanied in *Scarb1* null male mice by greater mineralized bone surface (1.37 fold), higher relative OB surface (1.42 fold) and bone formation rate (1.69 fold) (Table 2.3). Dynamic histology from female femurs yielded similar results (Table 2.3). To assess whether osteoclastic activity was altered, plasma CTX were measured (Fig. 2.4C); no significant difference was noted.

2.5.3 Functions of MSC in null mice

Since bone architecture and histology suggested enhanced osteoblastogenesis and/or osteoblastic cell activity, we further evaluated the expansion potential of MSC from *Scarb1* null mice. Expansion of MSC isolated from null mice was twice that observed in WT and independent of initial plating density (Fig. 2.5A - inset). To discriminate

whether the higher bone mass was solely linked to greater MSC number within the BM, MSC from either genotypes were harvested at confluence, seeded at 20 000 cells/cm² and left to proliferate in basal culture medium for 10 days. Even at similar initial plating densities, the MSC from null mice showed an enhanced proliferation at 7 and 10 days post-seeding (Fig. 2.5A). A greater propensity towards osteoblastic differentiation was also observed in MSC from null mice, as determined by ALP activity (Fig. 2.5B) and ARS staining (Fig. 2.5C), as well as increased gene expression of the osteoblastic transcription factor osterix (*Sp7*), yet lower caveolin-1 (*Cav1*) expression; collagen type 1 alpha 1 (*Colla1*) remained unaffected (Fig. 2.5D). MSC extracted from long bones of null female mice behaved similarly (data not shown).

2.5.4 Impact of high ACTH and high HDL on null MSC

SR-BI being associated with HDL-CE uptake by adrenal glands (Hoekstra *et al*, 2009), we investigated adrenal function in null mice. Corticosterone and ACTH levels were measured in both genotypes under normal housing conditions and following a 16h fast. The GC/ACTH ratio was significantly stunted in null mice, especially in 2-month-old individuals (Fig. 2.6A), associated with the absence of corticosterone peak following fasting-induced stress in *Scarb1* null mice and higher ACTH levels (data not shown). It was also determined how WT and null MSC respond to *in vitro* exposure to ACTH; in both cases, cells proliferate more in the presence of the hormone (Fig. 2.6B), suggesting that SR-BI is not involved in the proliferative response of MSC to this hormone. Similar impairment of corticosterone/ACTH axis was observed in *Scarb1* null females (data not shown).

Given that we reported cholesteryl ester and estradiol (E₂) selective uptake from HDL by OB (Brodeur *et al*, 2008c), we verified whether this process was impaired in *Scarb1* null MSC. Despite a decreasing trend, similar selective uptake levels for either cholesteryl oleate (CO) or E₂ was measured in MSC from *Scarb1* null and WT

mice (Fig. 2.6C). Hence, the contribution of SR-BI to selective uptake is either not its main role in OB or is spontaneously compensated.

Since we observed that *Scarb1* knockout impacts on the gene expression of *Cav1* by MSC, we looked forward the regulation of *Cav1* gene expression by the HDL in *Scarb1* null MSC. Gene expression of *Cav1* was increased by HDL in MSC from WT mice (Fig. 2.6D), whereas HDL was without effect on its gene expression in null MSC.

2.6 Discussion

Epidemiologic studies have linked atherosclerosis incidence with the development of osteoporosis (Farhat and Cauley, 2008; Jensky *et al*, 2011). Since studies attribute an atheroprotective role to SR-BI by contributing to HDL-mediated RCT (Brundert *et al*, 2005; Cuchel and Rader, 2006; Ji *et al*, 2011; Krieger, 2001; Trigatti *et al*, 1999) and that *Scarb1* null mice are prone to atherosclerosis, the present work therefore aimed at assessing the bone phenotype in *Scarb1* null mice. In accordance with the role of SR-BI in hepatic lipoprotein metabolism, our data indicate that *Scarb1* null mice show significantly higher serum cholesterol, especially HDL-associated, as previously reported (Rigotti *et al*, 1997). Despite their susceptibility to atherosclerosis, our results show that *Scarb1* null mice are not prone to osteoporosis but display high bone mass phenotype associated with enhanced bone formation.

Indeed bone analyses by microCT revealed that the *Scarb1* null mouse model displays higher relative trabecular bone mass accounted by significantly reduced trabecular spacing (data not shown) and increased trabecular number in null mice up to 4 months of age. Cortical bone and BMD values in both trabecular and cortical areas remained unaffected in male mice, whereas being increased in 2-month-old *Scarb1* null female mice. Histological data corroborated the microCT analyses: there was more mineralized bone in the femora of null mice translating to higher relative mineralized bone surface. Since the high bone mass phenotype observed in *Scarb1* null mice likely results from an imbalance in the cellular processes regulating bone resorption and formation, we determined the number of OB and OC in bone sections. The relative OB surface was higher by 1.31 to 1.42 fold in null mice. The number of OC per mm was similar between WT and null mice, suggesting a prevalently OB-mediated mechanism corroborated by similar plasma levels of bone resorption marker CTX in WT and null mice. Accordingly, the trabecular mineral apposition rate was significantly enhanced in these mice suggesting greater bone formation in the absence

of SR-BI. Morphometric values for cortical bone of *Scarb1* null male mice were not different when compared to WT mice, possibly due to higher turnover in the trabeculae relatively to the cortex (Clarke, 2008). However, female null mice showed similar enhanced trabecular bone mass in the femora but they differed from male in also displaying greater cortical bone volume and enhanced mineral apposition rate. This high bone mass phenotype is comparable to that observed in other mouse models deficient for key factors in cholesterol metabolism. Enhanced bone formation rate was reported in the *apolipoprotein (apo) E* null mouse model (Schilling *et al*, 2005); apoE acts as a ligand in lipoprotein clearance (Mahley *et al*, 1989) and *apoE* null mice develop atherosclerotic lesions (Meir and Leitersdorf, 2004). These indeed illustrate the significant influence of cholesterol metabolism-related genes on bone tissue.

We previously reported localisation of SR-BI in caveolae of OB (Brodeur *et al*, 2008c). Caveolin-1 is a structural protein of cholesterol-rich plasma membrane microdomain termed caveolae which are involved in intracellular cholesterol homeostasis (Frank *et al*, 2006) and cell signaling (Quest *et al*, 2008). However, SR-BI expression in non steroidogenic tissues such as bone (Brodeur *et al*, 2008c) underscores a previously unsuspected functionality. Though associated to selective CE and estradiol uptake in human and murine OB (Brodeur *et al*, 2008c), a thorough exploration of its functions in bone tissue has never been done. Given the expression of SR-BI by OB and the high bone mass phenotype of *Scarb1* null mice associated with enhanced bone formation, we undertook the functional characterization of long bone-derived MSC from *Scarb1* null mice. There were twice as many MSC in the bone marrow of null mice after 10 days of culture, which may result from both increased initial MSC number and enhanced cell proliferation. In accordance, MSC from null mice showed enhanced proliferation when compared to cells from WT mice. These findings agree with the high bone mass phenotype and enhanced bone formation in *Scarb1* null mice. Moreover, enhanced proliferation of *Scarb1* null cells

has been also reported in other cell types such as macrophages (Ji *et al*, 2011) and lymphocytes (Feng *et al*, 2011). In contrast, Xu *et al* (2012a) reported that genic silencing of *Scarb1* resulted in lower HDL-induced proliferation of rat MSC. In our study, the cells were grown in medium containing 10 % FBS which may account for the observed discrepancies between the two studies. Also, we observed a lower *Cav1* expression in our cultures, which was not verified by Xu *et al* (2012a). Some studies associate this protein with oncosuppressive properties due to the fact that its expression lowers the proliferation and metastatic potential of osteosarcoma cell lines (Cantiani *et al*, 2007). Moreover, neural stem cells (Jasmin *et al*, 2009) and mouse embryonic fibroblasts (Razani *et al*, 2001) of *Cav1* null mice do display higher proliferation rates, corroborating our observations.

MSC from null mice also displayed stronger ALP activity and Alizarin Red S staining following osteogenic treatment, suggesting a greater differentiation potential in the absence of SR-BI. In accordance, gene expression of the OB transcription factor *Sp7* was increased in confluent MSC from null mice prior to treatment. Therefore, the alterations in OB from null mice may significantly account for the bone phenotype observed in this study and *Scarb1* expression seemingly provides a repression mechanism to OB function. Similar higher bone mass phenotype and increased bone formation has been reported in *Cav1* null mice (Rubin *et al*, 2007). *Cav1* knockout has been associated with enhanced MSC osteogenic differentiation (Rubin *et al*, 2007) which corroborates high bone mass phenotype in null mice and it was suggested that *Cav1* expression helps to maintain OB progenitor cells in a less differentiated state. Accordingly, siRNA-mediated knockdown of *Cav1* expression in MSC derived from human bone marrow enhances their proliferation and osteogenic differentiation (Baker *et al*, 2012). Of interest, SR-BI has been reported to stabilize *Cav1* expression in kidney cells (Frank *et al*, 2002); there may therefore be common mechanisms leading to the bone phenotype of both *Cav1* and *Scarb1* null models.

In addition to the cell-autonomous OB alterations observed in MSC from null mice, our results indicate defective function of adrenal glands in *Scarb1* null mice as illustrated by the lower glucocorticoid (GC)/ACTH ratio. Indeed, impaired corticosterone response to fasting-induced stress associated to constitutively high levels of ACTH was observed in *Scarb1* null male mice (Hoekstra *et al*, 2008; 2009). Impaired GC synthesis reported in *Scarb1* null mice was previously associated with the lack of selective CE uptake by adrenals (Hoekstra *et al*, 2009); recently, it was demonstrated that GC insufficiency can be induced in normal mice through transplantation of adrenal glands from *Scarb1* null mice (Hoekstra *et al*, 2013). The constitutively high ACTH levels observed in the null mice was of interest to this study; indeed, ACTH has been shown to enhance bone mass by stimulating MSC proliferation and expression of several osteogenic markers (Blair *et al*, 2002; Isaacs *et al*, 2010; Zaidi *et al*, 2010). Interestingly, MSC isolated from either WT or null bone marrows seem to respond normally to this hormone in terms of proliferation. Therefore, high levels of ACTH associated with the adrenal gland dysfunction in the *Scarb1* null mice may contribute to the observed higher bone mass phenotype. Of interest, ACTH impact in bone has been linked to vascular endothelial growth factor (VEGF) (Zaidi *et al*, 2010). On the other hand, SR-BI has been shown to be essential for HDL-induced VEGF production in ischemia-driven angiogenesis (Tan *et al*, 2013). The relation between ACTH, VEGF and SR-BI seems to be quite complex; this question certainly deserves further investigation.

Since SR-BI is predominantly involved in the selective cholesterol uptake process by liver and adrenals glands (Hoekstra *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2005a), we verified its implication in the selective uptake by MSC. Though *Scarb1* null mice show impaired selective uptake functions in adrenal glands (Hoekstra *et al*, 2009) and liver (Brundert *et al*, 2005), it does not seem to be the case in MSC, regardless of the lipidic ligand used (e.g. CO or E₂). We in fact observed a non-significant decreasing trend. CD36 receptor is also expressed in OB (Brodeur *et al*, 2008c) and this receptor is able to

selectively uptake cholesterol from HDL yet at lower rate than SR-BI (Brundert *et al*, 2011). Our data therefore suggests that SR-BI has a minor contribution in the selective uptake process and/or the presence of compensatory mechanisms by other receptors. Our results also indicate an upregulation of *Cav1* in WT MSC following HDL exposure; however, no modulation of *Cav1* expression was observed in cells from null mice. Since SR-BI was shown to promote to the stabilization of *Cav1* expression in kidney cells (Frank *et al*, 2002), its absence may impair normal regulation of proliferation and differentiation thus further contributing to the enhanced bone mass.

2.7 Conclusions

This study associates SR-BI with significant functions in bone remodelling on 2 levels; by modulating ACTH/GC levels through cholesterol uptake in the adrenal glands, and by influencing proliferation and differentiation processes in MSC. Though the high levels of circulating ACTH likely exert a significant influence on these mice's bone mass, one cannot overlook the effects of *Scarb1* knockout in OB themselves. SR-BI seemingly slows bone formation at a cellular level, as MSC deficient for that receptor proliferate faster and differentiate more readily towards an osteoblastic lineage, potentially through modulation of *Cav1* expression. Further studies on the bone phenotype of *Scarb1* null mice should focus on OB-specific and adrenal cell-specific conditional deletions to discriminate between the impacts of OB-mediated mechanisms *versus* the effects of an altered endocrine condition on bone metabolism.

2.8 Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (RM: CIHR). CM is recipient of scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

Table 2.1. Whole body, abdominal fat and epididymal fat pads weight in 2-month-old male mice.

	Male	
	WT	Null
Total	23.0 ± 1.2	25.0 ± 2.9
Abdominal	0.323 ± 0.129	0.454 ± 0.181
Fat pads	0.114 ± 0.042	0.077 ± 0.025

Values (g) are mean ± SEM from 3-7 mice in each group.

Table 2.2. Plasmatic parameters in 2-month-old male mice.

	Male	
	WT	Null
ALP (μmol PNP/L*min)	556 \pm 58	556 \pm 32
Ca (mg/dL)	8.6 \pm 0.3	8.5 \pm 0.5
Pi (mg/dL)	10.2 \pm 0.8	10.6 \pm 0.6
Ca X Pi ⁽¹⁾	88 \pm 10	89 \pm 10
Glucose (mg/dL)	264 \pm 53	318 \pm 63

Values are means \pm SEM from 4 to 6 individuals per group

⁽¹⁾ The Ca X Pi indices were obtained by multiplying the Ca and Pi means within each group, and their relative errors were added to obtain the absolute error of the product.

Table 2.3. Average dynamic histomorphometric values from femora of WT and null mice.

	Males		Females	
	WT	Null	WT	Null
Relative OB surface (%)	20.5 ± 1.5	29.1 ± 3.0**	20.5 ± 2.4	26.9 ± 1.4*
Number of Oc/mm	5.2 ± 0.2	4.0 ± 0.3	5.4 ± 0.6	6.9 ± 0.6
Trabecular mineral apposition rate	1.48 ± 0.04	1.85 ± 0.06**	1.25 ± 0.20	1.61 ± 0.05*
Cortical mineral apposition rate	3.9 ± 0.5	5.3 ± 0.7	3.31 ± 0.76	5.50 ± 1.15*
Percent mineralizing surface (%)	23.3 ± 2.3	32.0 ± 2.9*	22.6 ± 1.1	33.6 ± 0.9*
Bone formation rate per bone surface	0.35 ± 0.04	0.59 ± 0.07***	0.28 ± 0.06	0.43 ± 0.03*

Values are means ±SEM from 5-7 mice in each group.

Mineral apposition rate: $\mu\text{m}/\text{day}$; Mineralized surface per bone surface: %; Relative osteoblast surface: %; Bone formation rate per bone surface: $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}/\text{d}$ and number of osteoclasts per mm: mm^{-1} .

Bonferroni post hoc test: * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs corresponding WT.

2.9 Figure Legends

Figure 2.1. Plasma cholesterol levels in 2- and 4-month-old WT and *Scarb1* null male mice.

Total, HDL-associated and LDL/VLDL-associated cholesterol fractions from plasma were quantified with the BioAssay Systems Enzychrom HDL, LDL/VLDL cholesterol kit. Values are means \pm SEM from 4-5 mice in each group. Bonferroni post hoc test: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT of corresponding age group.

Figure 2.2. Definition of the femoral cancellous and cortical volumes of interest (VOI) from WT and *Scarb1* null mouse bones.

The growth plate (GP) reference point is represented by the dashed line; VOI top and bottom are represented by filled lines. The average bone mineral density (BMD) was determined by microCT in (A) 2-month-old and (B) 4-month-old individuals. Values are means \pm SEM from 6-10 mice in each group.

Figure 2.3. MicroCT analyses of femoral VOI from 2- to 4-month-old WT and *Scarb1* null mice.

Morphometric parameters were evaluated in (A) cancellous and (B) cortical VOIs as defined in Fig. 2. Values are means \pm SEM from 6-10 mice in each group. Bonferroni post hoc test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT of corresponding age group

Figure 2.4. Histological analysis of mouse femora and plasma levels of CTX.

PMMA embedded bones harvested from calcein injected mice were sectioned, deplastified and stained for (A) Von Kossa (VK, 4X magnification), alkaline phosphatase (ALP, 10X magnification) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP, 10X magnification), or (B) photographed with a fluorescence microscope to observe the calcein fronts from the trabecular (TB) and cortical (CT) areas. Values for dynamic histology are listed in Tab. I and are from 5-7 mice in each group. (C)

Plasma levels of C-telopeptide of type I collagen (CTX) in 2- and 4-month-old WT and null mice. Values are from 3 to 6 individuals.

Figure 2.5. *In vitro* characterization of marrow-derived MSCs from WT and *Scarb1* null male mouse long bones.

Marrow was harvested from 2-month-old mouse femora and tibiae and characterized. (A) Time-course of WT and null MSC proliferation; Bonferroni post hoc test, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs WT. *Inset*: Number of adherent MSC isolated from WT and null bone marrow; Bonferroni post hoc test, $^{***}P<0.001$ vs WT. (B) Cellular ALP activity in MSC grown in osteogenic media for 21 days; paired Student t test, $^{*}P<0.05$. (C) Mineralization potential of MSC grown in osteogenic media for 21 days; paired Student t test, $^{**}P<0.01$. (D) Genic expression of osterix (*Sp7*), collagen 1 alpha 1 (*Colla1*) and caveolin-1 (*Cav1*) in null MSC relative to WT MSC; paired Student t tests, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. All experiments are from 3-4 independent cell preparations.

Figure 2.6. Impact of high ACTH or high HDL₃ on *Scarb1* null MSC.

(A) Corticosterone induction index by ACTH in fasted and fed states; Bonferroni post hoc test, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ vs WT. Plasma were harvested from 4-8 mice per group. (B) Proliferation response of WT and null marrow-derived MSC grown with or without 10 nM ACTH for 10 days; Bonferroni post hoc test, $^{***}P<0.001$. Values are from 3 independent cell preparations. (C) Selective cholesteryl oleate (CO) and estradiol (E₂) uptake from HDL₃ particles in WT and null MSC. Data are average \pm SEM from 3 to 6 independent cell preparations. (D) Gene expression of caveolin-1 (*Cav1*) in WT and null MSC in control conditions (Ctrl) and following stimulation for 24 h with HDL₃ (150 μ g/mL). Data are average \pm SEM from 4-6 independent cell preparations. $^{***}P<0.001$, significant differences versus Ctrl; $^{\delta\delta}P<0.05$, significant differences versus WT; Bonferroni post-hoc test.

Figure 2.1 Plasma cholesterol levels in 2- and 4-month-old WT and *Scarb1* null male mice.

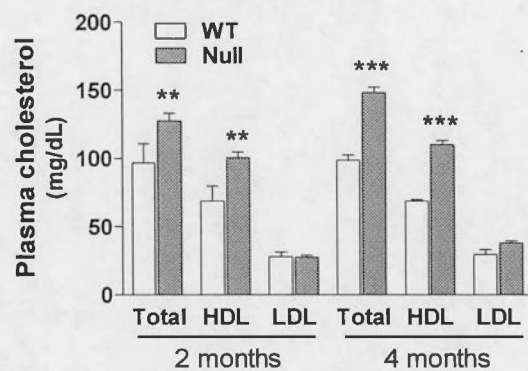


Figure 2.2 Definition of the femoral cancellous and cortical volumes of interest (VOI) from WT and *Scarb1* null mouse bones.

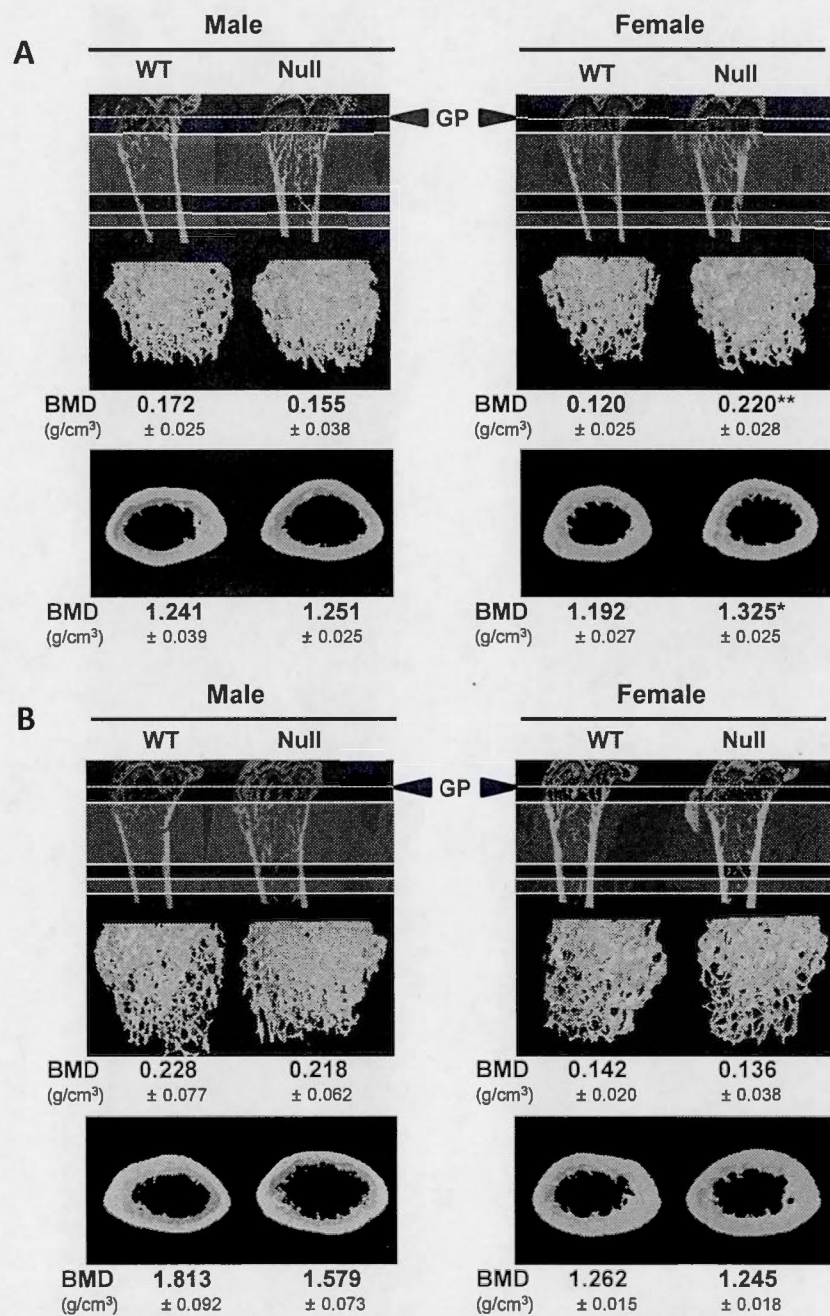
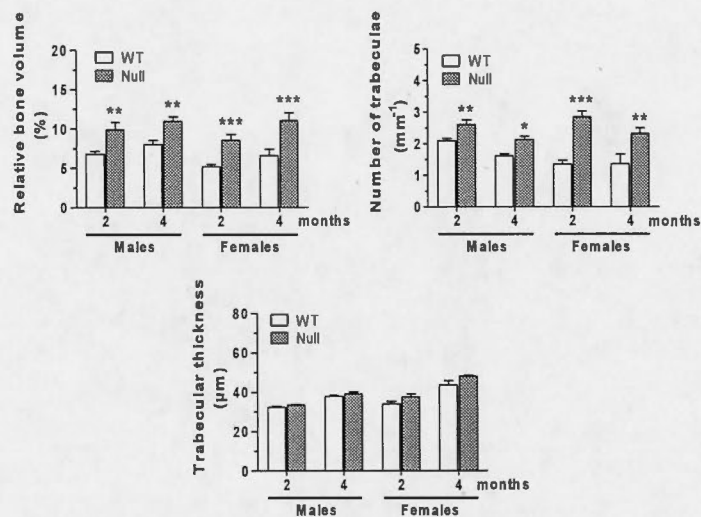


Figure 2.3 MicroCT analyses of femoral VOI from 2- to 4-month-old WT and *Scarb1* null mice.

A



B

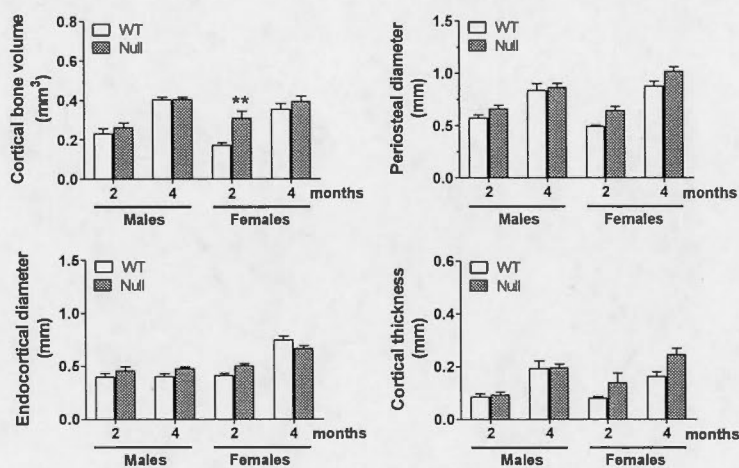


Figure 2.4 **Histological analysis of mouse femora and plasma levels of CTX.**

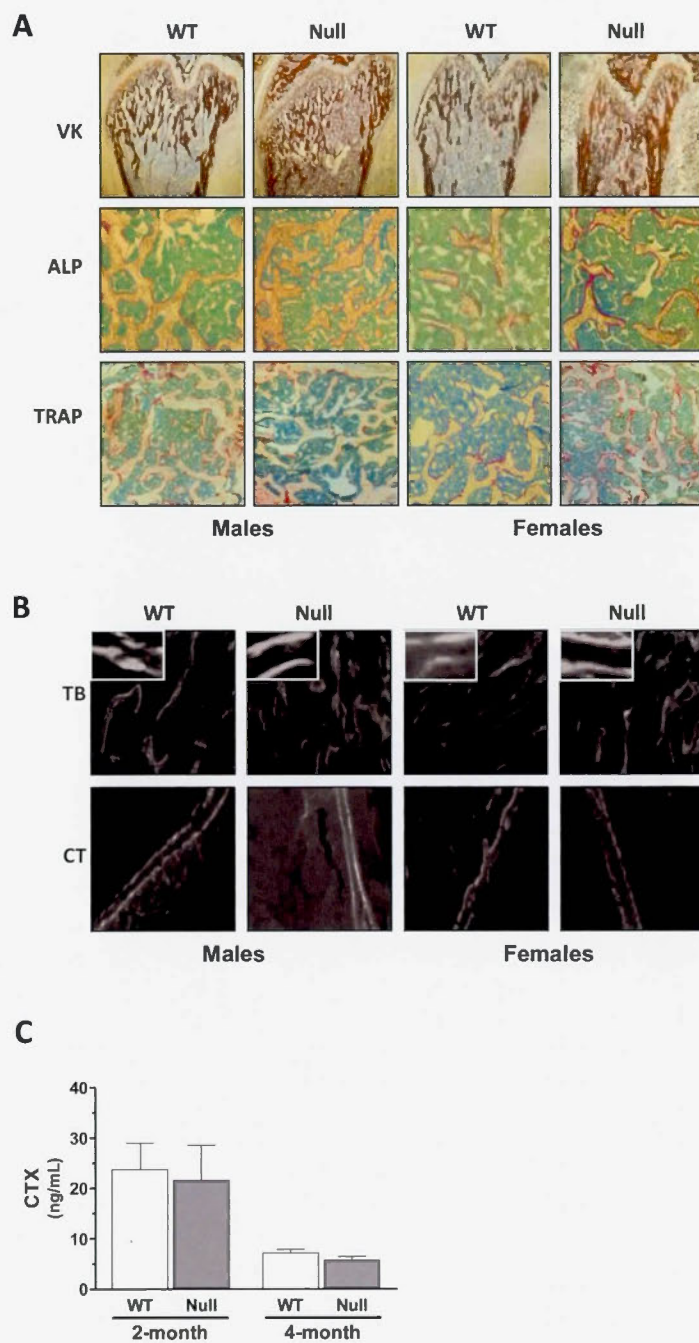


Figure 2.5 *In vitro* characterization of marrow-derived MSCs from WT and *Scarb1* null male mouse long bones.

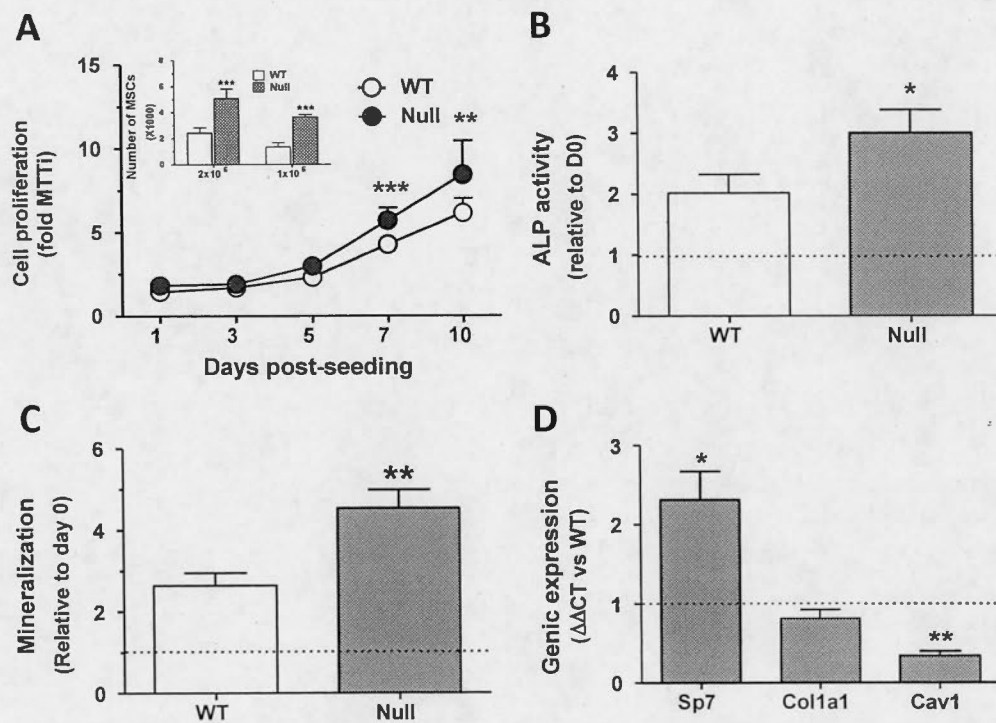
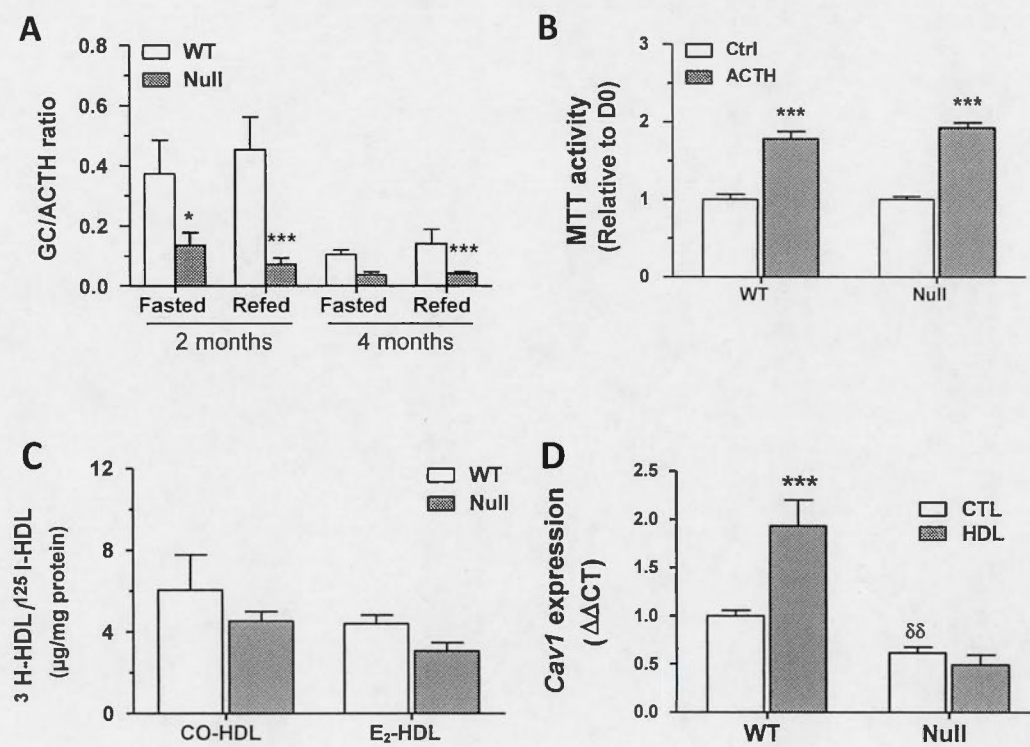


Figure 2.6 Impact of high ACTH or high HDL₃ on *Scarb1* null MSCs.



CHAPITRE III

GENDER- AND REGION-SPECIFIC ALTERATIONS OF BONE METABOLISM IN *SCARB1*-NULL FEMALE MICE

Corine Martineau¹, Louise Martin-Falstra², Louise Brissette², Robert Moreau^{1*}

¹Laboratoire du métabolisme osseux, BioMed, Département des sciences biologiques,
Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3C 3P8

²Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines, BioMed, Département des sciences
biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc, Canada, H3C 3P8

Journal of Endocrinology 222:277-288

Avant-propos

Ce second article a permis de comparer le phénotype osseux des souris mâles et femelles déficientes pour *Scarb1*. Les résultats suggèrent que la déficience pour *Scarb1* affecte les mâles et les femelles différemment; quoique les deux genres présentent une masse osseuse augmentée ainsi que des niveaux constitutivement élevés d'ACTH, les femelles montrent des altérations au niveau des vertèbres lombaires ainsi qu'une perturbation de l'axe hormonal de la leptine. Ces deux dernières observations sont spécifiques aux femelles et ne surviennent pas chez les mâles, du moins aux âges analysés. Des recherches approfondies ont démontré que les niveaux d'estradiol total chez les souris femelles déficientes pour *Scarb1* ne sont toutefois pas affectés, suggérant que les œstrogènes ne sont pas la cause principale. Cependant, les cellules stromales de la moelle osseuse des femelles déficientes pour *Scarb1* affichent également des potentiels de prolifération et de différenciation ostéoblastique augmentée, ainsi qu'une surexpression d'OSX, soulignant que les mécanismes cellulaires perturbés par l'absence du SR-BI sont similaires dans les deux genres mais que les altérations endocrines semblent liées au genre. La raison pour laquelle ce dimorphisme sexuel apparaît dans ce modèle murin demeure spéculative.

La récolte des échantillons osseux et sériques a été effectuée par Louise Martin-Falstrault et moi-même; toutes les expériences et les analyses subséquentes ont été effectuées par moi-même. L'interprétation des résultats ont été faites par Robert Moreau, Louise Brissette et moi-même. J'ai rédigé l'article sous la supervision de Louise Brissette et Robert Moreau. Cet article est publié dans la revue *Journal of Endocrinology*, ayant un facteur d'impact de 3.586 en 2014.

3.1 Résumé

Une corrélation positive entre les niveaux plasmatique de lipoprotéines de haute densité (HDL) et la masse osseuse est rapportée dans certaines études épidémiologiques. Puisque le récepteur scavenger de classe B, type I (SR-BI), produit du gène *Scarb1*, est reconnu pour réguler le métabolisme des HDL, nous avons récemment caractérisé le métabolisme osseux chez les souris déficientes pour *Scarb1*. Ces souris affichent une masse osseuse fémorale élevée, associée à une hausse de la formation osseuse. Puisque des différences entre les genres ont été rapportées dans le métabolisme des lipoprotéines et les fonctions du SR-BI, nous avons investigué les altérations osseuses propre à chaque genre dans les souris déficientes pour *Scarb1* par microtomographie et par histologie. Nous avons trouvé un volume osseux relatif 16 % plus élevé et un taux de formation osseuse augmenté de 39 % dans les vertèbres de souris femelles de 2 mois déficientes pour *Scarb1*. Aucune altération de ce type n'a été vue chez les mâles, indiquant des différences de phénotype squelettique spécifiques au genre et à la région. Le cholestérol total et associé aux HDL, ainsi que les niveaux plasmatiques d'hormone adrénocorticotropique (ACTH), étaient élevés dans les deux genre déficients pour *Scarb1*, ces derniers étant concurrent à une réponse réduite de la corticostérone suite au jeûne. Les niveaux plasmatiques d'estradiol ne différaient pas entre les femelles contrôles (WT) et déficientes pour *Scarb1* suggérant qu'une altération du métabolisme des œstrogènes n'est pas pertinente à la masse osseuse vertébrale augmentée chez les souris femelles déficientes pour *Scarb1*. Des niveaux plasmatiques constitutivement élevés de leptine accompagnés d'une hausse de 2.5 fois de son expression dans le tissu adipeux blanc ont été mesurés chez les femelles déficientes pour *Scarb1* seulement. L'exposition *in vitro* de cellules stromales de la moelle (MSC) à l'ACTH et à la leptine ont promu la différenciation des OB tel que mis en évidence par la hausse de l'expression génique d'ostérix et du collagène de type I alpha. Nos résultats suggèrent que l'hyperleptinémie pourrait expliquer la masse osseuse élevée spécifique au genre observée dans les vertèbres des souris femelles déficientes pour *Scarb1*.

3.2 Abstract

A positive correlation between plasma levels of high-density lipoprotein (HDL) and bone mass has been reported by epidemiological studies. Since scavenger receptor class B, type I (SR-BI), the gene product of *Scarb1*, is known to regulate HDL metabolism, we recently characterized bone metabolism in *Scarb1*-null mice. These mice display high femoral bone mass associated with enhanced bone formation. Since gender differences have been reported in HDL metabolism and SR-BI function, we investigated gender-specific bone alterations in *Scarb1*-null mice by microtomography and histology. We found 16 % greater relative bone volume and 39 % higher bone formation rate in vertebrae from 2-month-old *Scarb1*-null females. No such alteration was seen in males, indicating gender- and region-specific differences in skeletal phenotype. Total and HDL-associated cholesterol, as well as adrenocorticotrophic hormone (ACTH) plasma levels, were increased in both *Scarb1*-null genders, the latter being concurrent to impaired corticosterone response to fasting. Plasma levels of estradiol did not differ between null and wild-type (WT) females suggesting that the estrogen metabolism alteration is not relevant to the higher vertebral bone mass in female *Scarb1*-null mice. Constitutively high plasma levels of leptin along with 2.5-fold increase of its expression in white adipose tissue were measured in female *Scarb1*-null mice only. *In vitro* exposure of bone marrow stromal cells (MSC) to ACTH and leptin promoted OB differentiation as evidenced by increased gene expression of osterix and collagen type I alpha. Our results suggest that hyperleptinemia may account for the gender-specific high bone mass seen in vertebrae of female *Scarb1*-null mice.

3.3 Introduction

Bone tissue is constantly renewed in a process called remodeling. Remodeling relies on the activities of specialized cells, bone-forming osteoblasts (OB) and bone-resorbing osteoclasts (OC), to maintain bone mass (Clarke, 2008). The balance between bone formation and resorption involves the regulation of bone cell activities by several endocrine and paracrine axes including steroid hormones (Frenkel *et al*, 2010), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Isales *et al*, 2010) and cytokines (Hughes *et al*, 2006). Uncoupling of the formation and resorption processes results in improper bone mass maintenance. Bone mass results from the difference between peak bone mass, defined as the completion of skeletal growth typically occurring in early adulthood, and age-related bone loss (Rizzoli *et al*, 2001; Stagi *et al*, 2013). It is generally accepted that the key determinant in healthy bone is the achievement of a higher peak bone mass, which delays or even prevents the onset of osteoporosis later on in life (Stagi *et al*, 2013).

Several factors influence peak bone mass, predominantly gender, genetics, physical activity, as well as vitamin D and calcium intake (Rizzoli *et al*, 2001; Stagi *et al*, 2013). It is a well-known fact that men tend to achieve higher peak bone mass than do women, presumably due to the longer period of bone mass gain in the former (Rizzoli *et al*, 2001). Bone accrual is also site-specific within the same skeleton, with preferential bone mineral accumulation in the lumbar vertebrae and femoral neck (Bonjour *et al*, 2009; Rizzoli *et al*, 2001); these also happen to be common sites for osteoporotic fractures and show the greatest gender-related dimorphism (Bonjour *et al*, 2009; Raisz, 2005). Several determinants of peak bone mass are common to that of osteoporosis; factors that compromise bone mass are attributed to race, smoking, inactive lifestyle, malnutrition, and underlying metabolic disorders like diabetes and atherosclerosis are often associated with lower bone mass (Leidig-Bruckner and

Ziegler, 2001; Stojanovic *et al*, 2011; Sweet *et al*, 2009). Genetic control of bone mass is polygenic and the specific genes involved are beginning to be enumerated, such as genetic variants/mutations of vitamin D and estrogen receptors (Mitchell and Yerges-Armstrong, 2011). Recent attention has been given to atherogenic conditions with low HDL plasma levels as factors compromising bone health, and numerous associations have been revealed between lower bone mass and cardiovascular diseases (Adami *et al*, 2004; Banks *et al*, 1994; Barengolts *et al*, 1998; Hegsted, 2001; Orozco, 2004; Poli *et al*, 2003; von der *et al*, 1999; Uyama *et al*, 1997; Yamaguchi *et al*, 2002). In accordance, a positive correlation between plasma HDL levels and bone mass has been reported by epidemiological studies (reviewed in Ackert-Bicknell, 2012), suggesting that in addition to protecting against atherosclerosis, HDL contribute to a healthy environment for bones.

Product of the *Scarb1* gene, the scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is recognized as a high affinity HDL receptor (Acton *et al*, 1996) and is known for its role in HDL metabolism (Cuchel and Rader, 2006). *Scarb1*-null mice show high HDL-associated cholesterol (HDL-C) levels due to impaired selective uptake of cholesterol by the liver (Rigotti *et al*, 1997). Also, *Scarb1*-null male mice exhibit lack of SR-BI-mediated cholesterol uptake from HDL by the adrenal glands and concurrent impaired corticosterone response to stress and high plasma levels of ACTH (Hoekstra *et al*, 2008; Hoekstra *et al*, 2013; Martineau *et al*, 2014a). Given that we reported expression of SR-BI by OB (Brodeur *et al*. 2008c), we recently characterized bone metabolism in *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a). Higher trabecular bone mass in femora, and greater proliferation rate and differentiation of bone-marrow mesenchymal stromal cells (MSC) were found in *Scarb1*-null mice, concurrent to enhanced bone formation. Of interest, differences between male and female *Scarb1*-null mice were observed in cortical bone volume of femurs from *Scarb1*-null female mice which had increased volume compared to WT mice whereas no difference was noted in males.

Skeleton sexual dimorphism is generally attributed to sex steroids such as estradiol (E_2), but also to growth hormone, insulin-like growth factor and mechanical sensitivity to loading (Callewaert *et al*, 2010). Gender differences in lipoprotein metabolism have also been evidenced (for a review: Knopp *et al*, 2005), but it is unknown if and how this affects bone. Of interest, lower levels of SR-BI are found in liver of female mice (Brodeur *et al*, 2005) and in accordance, estrogen was shown to reduce hepatic SR-BI expression. In contrast, SR-BI expression in adrenal glands is increased by estrogen (Landschulz *et al*, 1996) and its expression is enhanced by ACTH (Sun *et al*, 1999). Additionally, the adipokine leptin was shown to stimulate SR-BI expression in hepatocytes (Lundasen *et al*, 2003). Sex differences in adipose tissue, the main source of leptin, were documented and recently, leptin was identified as an important direct bone growth modulator (Turner *et al*, 2013); gender-related differences in regard to effects of leptin on bone were also noted (Thomas *et al*, 2001). Thus, the observed gender differences in bone structure of *Scarb1*-null mice may be related to the estrogen, ACTH and/or leptin hormonal axes. This study therefore aimed at assessing how *Scarb1* deficiency could produce gender-specific skeletal alterations in mice through analysis of vertebral architecture, serology and MSC response to relevant endocrine factors.

3.4 Material and methods

3.4.1 Animals

Scarb1-null mice on a C57BL6/129 background were obtained from Jackson Laboratories (stock no. 003379; Bar Harbor, ME, USA) and crossed-bred with WT C57BL/6 mice. Due to their low fertility, *Scarb1*-null females were fed a 0.5 % probucol diet (Research Diet, New-Brunswick, NJ, USA) for 10 days prior to mating (Miettinen *et al*, 2001). The heterozygous (HZ) progeny were mated to obtain first generation (F1) WT and null couples; HZ, WT and null couples were bred in parallel throughout each generation to allow littermate and inter-litter comparisons, as well as to insure that probucol did not affect the observed phenotype. All animals were kept under a 12 h/12 h day/light cycle at 25 °C with free access to food and water, unless specified otherwise. Two and 4-month-old mice ranging from F7 to F10 were used throughout the study. The mice used for the ACTH/GC study were the same as used in (Martineau *et al*, 2014a); individuals were added to complete the leptin study and lumbar vertebrae analyses. All experiments were performed according to UQÀM Institutional Animal Care Committee guidelines (#611). Following euthanasia, whole body, abdominal fat and uterine weights were determined.

3.4.2 Serology

Whole blood was harvested through cardiac punctures and collected in 3mL heparinated tubes (68 USP, BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada). Plasma was obtained by centrifugation at 2000 *g* for 25 min at 4 °C and stored at -80 °C until analyses. Calcium, phosphate and glucose were evaluated by QuantiChrom assays (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), and alkaline phosphatase (ALP) and total/lipoprotein-associated cholesterol were quantified using EnzyChrom assays (BioAssay Systems) all according to manufacturer's recommendations. 17- β -E₂ levels were measured with commercially available ELISA kits (Cayman Chemical, Ann Arbor Mi, USA) according to manufacturer' instructions. For plasma level

determinations of corticosterone (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), ACTH (MyBioSource, San Diego, CA, USA), leptin (Millipore, Billerica, MA, USA) and adiponectine (Millipore), mice were fasted overnight (16h); half of them were refed for 2 h prior to anesthesia with Isoflurane (PPC, Richmond Hill, ON, Canada) and whole blood collection. All mice were killed by CO₂ asphyxiation following anesthesia and whole blood collection.

3.4.3 Microcomputed X-ray tomography

Following euthanasia, lumbar vertebrae were harvested and fixed in 4 % paraformaldehyde (PF) in phosphate-buffered saline (PBS) for 16-18 h at 4 °C. The vertebrae were scanned with a Skyscan 1172c table top MicroCT system (Soquelec, Montreal, Qc, Canada) using the following parameters: 5 µm pixel size, 70 kV/100 µA tube voltage/current, 1200 ms exposure time and a 0.5 mm aluminium filter. Raw images were optimized and reconstructed with NRecon software (Skyscan, Aartselar, Belgium); the volumes of interest (VOI) were defined as 230 slices, 100 slices below the intervertebral space (Fig. 3.1A). The threshold was set at 80 to discriminate bone from soft tissue and binary images were subsequently analyzed with CTAn (Skyscan) to obtain the following microCT parameters: relative bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), number of trabeculae (Tb.N) and trabecular spacing (Tb.Sp). Bone mineral density (BMD) was evaluated using a standard curve obtained from 2mm diameter hydroxyapatite rods (Skyscan) scanned with the same parameters.

3.4.4 Static and dynamic histology

Two-month-old mice were injected twice with 20 mg of calcein (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) per kg body weight 10 and 2 days prior to euthanasia. Lumbar vertebrae were dissected and fixed for 16-18 h in PBS with 4 % PF at 4 °C. Bones were processed and embedded in low-temperature polymerizing polymethylmethacrylate (PMMA) (Erben, 1997), sectioned transaxially starting 20

slices below the caudal growth plate at a 6 μm thickness with a rotary HM 360 microtome (ThermoFisher, Ottawa, ON Canada). Calcein fronts were observed with a fluorescent microscope (Nikon FN1 Eclipse, Mississauga, ON, Canada) and averaged from the top (sections 20-25), middle (sections 35-40) and bottom (sections 45-50) for each sample. In parallel, bone sections were stained with the Von Kossa technique, and for ALP (Millipore) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP; Dako, Burlington, ON, Canada) activities. Von Kossa, ALP and TRAP-stained bone sections were visualized with an inverted phase contrast microscope (TE-300, Nikon) and analyzed with ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) to evaluate the following static and dynamic parameters: relative osteoblast surface (Ob.S/BS on ALP-stained sections), number of osteoclasts (#Oc/mm on TRAP-stained sections), percent mineralizing surface (MS/BS), mineral apposition rate (MAR) and bone formation rate (BFR/BS). MS/BS was calculated as $\text{dL} + (\text{sL}/2)/\text{BS}$, where dL and sL are double- and single- labeled surfaces, respectively.

3.4.5 Marrow-derived stromal cultures

Femora and tibiae from 2-month-old female WT and null mice were denuded of any soft tissue, sterilized twice for 30 min in PBS supplemented with 200 U/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and 0,2 % FungiZone (Invitrogen) (PBS-PSF), then transferred into fresh PBS-PSF under a sterile hood. The epiphyses were cut off and marrow was flushed out by 8000 rpm for 1 min in an Eppendorf table top centrifuge (Mississauga, ON, Canada), suspended in PBS and cell clumps were broken up by repetitive extrusions. The suspension was diluted in αMEM (Invitrogen) containing 25 $\mu\text{g/mL}$ L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich). The marrow cells were plated in 100 mm dish (Sarstedt, Montréal, Qc, Canada; bones from 1 mouse per dish) and left to adhere for 7 days in αMEM with 10 % FBS (Cansera, Etobicoke, ON, Canada) and 25 $\mu\text{g/mL}$ of L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich). Non-adherent cells were then vigorously washed away with PBS-PSF. Cells were left to reach confluence, washed twice with PBS and harvested for experimentation.

3.4.6 Osteoblastic differentiation

Adherent MSC were harvested and seeded at 50 000 cells/cm² in 24-well plates (Sarstedt), left to reach confluence and treated for 21 days in osteogenic medium consisting of MEM (Invitrogen) with 10 % FBS, 50 µg/mL L-ascorbic acid and 3 mM glycerol-2-phosphate (Sigma-Aldrich). Osteoblastic differentiation was assessed through ALP (Millipore) and Alizarin S (Sigma-Aldrich) staining. Alizarin S was solubilized in 10 % cetylperidinium chloride and its optical absorbance was read at 575 nm.

3.4.7 Real-time PCR

Cells were kept for 24 h in α MEM with 10 % FBS or in MEM containing 2 % FBS with or without 100 ng/mL leptin (Sigma-Aldrich) or 10 nM ACTH (Tocris Bioscience, Bristol, UK), lysed with RiboZol (Amresco, Solon, OH, USA) and total RNA was extracted as recommended by the manufacturer. Total RNA was reversed transcribed using AMV RT (Roche, Laval, QC, Canada) accordingly to manufacturer's instructions. Complementary DNA was used to perform PCRs with the following primer pairs: reference gene β -microglobulin (*B2m*; F: 5'-TACTCACGCCACCCACCGGAG-3', R: 5'-GCTCGGCCATACTGGCATGCT-3'), and osteoblastic markers osterix (*Sp7*; F: 5'-TTCGCATCTGAAAGCCCACT-3', R: 5'-TGCGCTGATGTTTGCTCAAG-3'), collagen type I (*Colla1*; F: 5'-ACTTCAGCTTCCTGCCTCAG-3' R: 5'-GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC-3') and sclerostin (*Sost*; F: 5'-CAGGAATGATGCCACAGAGGT-3'; R: 5'-GTCTGTCAGGAAGCGGGTG-3'). In parallel, RNA was extracted from white adipose tissue of 2 month-old mice, reverse transcribed and used to observe the expression of leptin (*Lep*; F: 5'-TGCGGCCCAAGAGAGGTGAG-3', R: 5'-AAGCAGCACCCCAAGGAGCCT-3'). PCR reactions were carried out in a MyiQ Thermocycler (BioRad, Mississauga, ON, Canada) for 40 cycles, with a denaturation temperature of 95 °C (10 sec), an annealing temperature of 58 °C (30 sec) and a 5 min

terminal elongation at 72 °C. Relative fluorescence was analyzed with the iQ5 software (BioRad).

3.4.8 Statistical analyses

Data were analysed with the Prism5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) for statistical differences. Two-way ANOVAs and multiple comparisons by Bonferroni, as indicated in the figure legend, were applied to determine statistical significance; a p value of 0.05 was considered as the significance threshold. All data are presented as mean \pm SEM.

3.5 Results

3.5.1 Higher vertebral bone mass in *Scarb1*-null female mice

Previously, we observed a high femoral bone mass phenotype associated with enhanced bone formation in both male and female *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a). However, the cortical bone volume of *Scarb1*-null female mice was increased compared to WT whereas no difference was noted for males (Martineau *et al*, 2014a). Therefore, we further investigated gender-specific bone phenotype and endocrine dysfunction in *Scarb1*-null mice. Total body weight was not significantly different between WT and *Scarb1*-null female mice (18.2 ± 1.1 vs 21.5 ± 3.8 g), and no significant difference was observed in abdominal fat (0.14 ± 0.03 vs 0.19 ± 0.09 g) and uterus (0.12 ± 0.04 vs 0.14 ± 0.06 g) weights between 2-month-old WT and *Scarb1*-null female mice. Similarly, total body weight was not different between male *Scarb1*-null and WT mice (Martineau *et al*, 2014a). To assess whether SR-BI deficiency caused any metabolic, renal or mineral disorder, plasmatic levels of calcium, phosphate, ALP and glucose were measured in 2-month-old WT and *Scarb1*-null females; no significant alterations were detected between WT and *Scarb1*-null female mice (Table 3.1), being similar to male mice (Martineau *et al*, 2014a).

Representative microtomographic renderings from lumbar vertebrae qualitatively showed alterations of bone architecture (Figure 3.1A). Two-month-old *Scarb1*-null female mice showed higher relative bone volume, increased number of trabeculae and BMD, as well as lower trabecular spacing compared to female WT (Table 3.2). The relative vertebral bone mass of *Scarb1*-null female mice thereafter was similar to control values at 4 months of age. Trabecular thickness values remained unaffected at 2 months, yet they were significantly lower at 4 months. In contrast, microtomographic analysis revealed unchanged vertebral structure in 2-month-old

Scarb1-null male mice (Table 3.2) but trabecular thickness was also reduced in 4-month-old *Scarb1*-null male mice.

3.5.2 Enhanced bone formation in vertebrae from *Scarb1*-null female mice

To assess whether this higher lumbar bone mass was due to either altered osteoblastic or osteoclastic functions, histochemistry was performed on samples from 2-month-old mice (see Fig. 3.1B for representative bone sections). Von Kossa staining showed more mineralized tissue in vertebrae from *Scarb1*-null female mice. Concomitantly, the ALP staining was visibly enhanced in the vertebrae from *Scarb1*-null female mice whereas ALP staining of bone sections from male WT and *Scarb1*-null mice was similar. The TRAP staining remained similar between WT and *Scarb1*-null mice of both genders, indicating a predominantly osteoblastic alteration. In accordance, the relative osteoblastic surface per bone surface (Ob.S/BS) was significantly higher in vertebra from *Scarb1*-null female mice, as the number of osteoclasts (#Oc/mm) remained unaffected (Table 3.3). Dynamic histological evaluation yielded similar results, as lumbar mineral apposition rates (MAR) and bone formation rates (BFR) were enhanced in the *Scarb1*-null female mice (see Fig. 3.1B for typical calcein fronts).

3.5.3 Disrupted GC/ACTH and leptin/adiponectin axes in null females

Since SR-BI is involved in lipoprotein metabolism (van der Velde and Groen, 2005), we measured the cholesterol plasma profile in *Scarb1*-null mice. The fractions of total plasma cholesterol and HDL-associated cholesterol were increased at similar levels in *Scarb1*-null males and females (Fig. 3.2), which suggests that gender-specific differences in vertebral bone mass in *Scarb1*-null mice is not related to differences in HDL level.

As we and others have previously reported an impaired corticosterone response to fasting and constitutive high plasma levels of ACTH in male *Scarb1*-null mice

(Hoekstra *et al*, 2008; Martineau *et al*, 2014a), we asked if differences in the GC/ACTH axis may also be exhibited by female *Scarb1*-null mice. The *Scarb1*-null females showed impaired corticosteroid response following fasting (Fig. 3.3A); this condition was accompanied by higher levels of ACTH under refed condition in *Scarb1*-null females (Fig. 3.3B). This relationship is better illustrated in Fig. 3.3C, as the GC/ACTH ratio is reduced in the refed condition for *Scarb1*-null females. Though being significantly lower in all null mice *versus* WT, the GC and ACTH variation between fasting and refed states tended to be greater in female *Scarb1* null mice when compared to the null males, however without reaching statistical significance (Fig. 3.3D). Our results suggest that gender-specific differences in vertebral bone mass in *Scarb1*-null mice are not related to GC/ACTH axis. Since vertebral high bone mass was specific to female *Scarb1*-null mice, we measured plasma estrogen levels. No difference for total estradiol plasma levels between WT and *Scarb1*-null female mice was detected (Fig. 3.4).

Since E₂ status was unaffected in our model and given that several studies have observed region- and gender-specific effect of leptin (Hamrick *et al*, 2004; Thomas *et al*, 2001; Wang *et al*, 2007b), we questioned whether leptinemia was affected in null mice. As expected, plasma levels of leptin were increased by feeding in both WT genders as well as null males (Fig. 3.5A and B). However, plasma levels of leptin were constantly elevated in fasted *Scarb1*-null female mice compared to the corresponding WT, which translated in reduced leptin induction in refed mice (Fig. 3.5C). This was not observed in males. No difference between WT and *Scarb1*-null mice was noticed for adiponectin (fasting values in 2-month-old females: 1.9±0.1 ng/mL in WT vs 2.0±0.2 ng/mL in nulls, 4 per group). As the white adipose tissue is the main source of leptin production (Guerre-Millo, 2004), we verified its expression in WT and null mice. We measured a 2.5-fold increase in *Lep* gene expression of white adipose tissue from the female null mice compared to their WT counterparts (Fig. 3.5D). Such difference was not observed in male mice.

3.5.4 *In vitro* MSC response to leptin and ACTH

We recently reported that MSC from *Scarb1*-null male mice have enhanced proliferation rate and differentiation potential (Martineau *et al*, 2014a). Similarly, enhanced rates of proliferation (1.5-fold) and higher ALP activity with increased matrix mineralization (1.8-fold) were observed in null MSC from female mice (data not shown). In addition, gene expression of the osteoblastic transcription factor *Sp7* was also upregulated in null MSC from females (Fig. 3.6A), whereas *Colla1* was not different (Fig. 3.6B) and *Sost* was down-regulated (Fig. 3.6C); similar observations were made in cells isolated from male mice (*Sp7*: 2.3-fold, *Sost*: 0.4-fold vs WT, data not shown). Following treatment with leptin or ACTH, gene expression of *Colla1* was increased in MSC from WT and *Scarb1*-null female mice (Fig. 3.6B). In contrast, gene expression of *Sp7* and *Sost* were not further regulated by ACTH and leptin in MSC from *Scarb1*-null female mice (Fig. 3.6A and C).

3.6 Discussion

Recently, we reported enhanced trabecular bone formation in femora from *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a). Interestingly, differences between males and females were observed in cortical bone volume of *Scarb1*-null mice which was increased compared to WT mice in females only (Martineau *et al*, 2014a). The current study further assessed gender-specific bone alterations in *Scarb1*-null mice. Our data indicate that 2-month-old *Scarb1*-null females have higher vertebral bone mass concurrent with greater bone formation rate whereas no difference was seen in male *Scarb1*-null mice compared to WT mice. Therefore, we explored the potential conditions responsible for this gender difference. Higher levels of total cholesterol and HDL-C were measured in both male and female *Scarb1*-null mice, in accordance with the role of SR-BI in HDL metabolism. Impaired corticosterone response to fasting and constitutive high plasma ACTH levels were measured in female null mice, as in males (Martineau *et al*, 2014a). ACTH promoted *in vitro* OB differentiation of WT MSC as evidenced by increased gene expression of *Sp7* and *Coll1a1*, and reduced *Sost* gene expression, indicating that ACTH may contribute to the high bone mass phenotype of null mice. In contrast, high plasma leptin levels and enhanced *Lep* gene expression in adipose tissue were seen in null females only. Moreover, leptin had anabolic effects *in vitro* by increasing differentiation of WT MSC through up-regulation of *Sp7* and *Coll1a1* expression, and reduced *Sost* expression, suggesting that increased plasma leptin may account for the gender-specific high bone mass seen in the femoral cortical region and vertebrae of null females. In addition to these anabolic systemic conditions, MSC from *Scarb1*-null females displayed enhanced proliferation (data not shown) and differentiation potentials, as observed in null MSC from male mice (Martineau *et al*, 2014a).

High bone mass phenotype in *Scarb1*-null mice seemingly contradicts a positive correlation between efficient HDL metabolism and bone mass, suggested by several

studies (Ackert-Bicknell, 2012). In accordance with its role in RCT, *Scarb1*-null mice were shown to be prone to atherosclerosis (Huby *et al*, 2006) due to impaired selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and associated with abnormally cholesterol-enriched HDL particles (Rigotti *et al*, 1997). Therefore, the contribution of SR-BI to efficient RCT appears to be unrelated to the bone alterations in *Scarb1*-null mice. Moreover, a positive correlation between levels of HDL-C and bone mass has also been reported in experimental mouse strains (Mouse phenome database, Jackson Laboratories), underscoring its significance for bone metabolism. In accordance, both male and female *Scarb1*-null mice show similar high levels of total cholesterol and HDL-C that could account for the higher bone mass phenotype of these mice, but not for gender differences in bone status. Our results show that 2-month-old *Scarb1*-null female mice have higher bone mass and enhanced formation rate in lumbar vertebrae whereas no significant alteration was observed in males. Such gender-associated bone features were also noted in femoral cancellous and cortical bone from *Scarb1*-null female mice (Martineau *et al*, 2014a). These data indicate that SR-BI deficiency is associated with gender-specific differences in skeletal phenotype. Overall, the absence of SR-BI translates in a more generalized high bone mass phenotype in female mice, whereas this was limited to trabecular bone in *Scarb1*-null males (Martineau *et al*, 2014a).

Considering the high expression of SR-BI in ovaries and adrenal glands (Rigotti *et al*, 1997), relevant hormonal axes were explored. Impaired corticosterone response to fasting accompanied by constant high ACTH levels were observed in *Scarb1*-null females, similarly to *Scarb1*-null males (Hoekstra *et al*, 2008; Martineau *et al*, 2014a). As ACTH is recognized to have anabolic effects on bone metabolism (Isales *et al*, 2010), its higher plasma levels correlate with the high bone mass of both male and female *Scarb1*-null mice. Therefore, such systemic alterations in both genders of *Scarb1*-null mice constitute anabolic conditions for bone formation, agreeing with the observed high bone mass phenotype. Nevertheless, gender differences in bone

phenotypes of *Scarb1*-null mice may not rely on the GC/ACTH axis alterations. We next investigated whether E₂, a powerful bone growth modulator (Frenkel *et al*, 2010), was affected in *Scarb1*-null females. Total E₂ levels were normal in *Scarb1*-null females, therefore discarding the disruption of this hormonal axis as a major factor for the gender-specific bone alterations. Though female *Scarb1*-null females show reduced fertility (Miettinen *et al*, 2001), their ovarian functions are normal in terms of progesterone and E₂ production (Rigotti *et al*, 2003), indicating existing compensatory mechanisms in some aspects. Moreover, HDL carrying a large proportion of esterified estrogens in the bloodstream (Hockerstedt *et al*, 2002), it is unknown whether *Scarb1* deficiency impacts the distribution of E₂ esters vs free E₂.

Since SR-BI was shown to be abundantly expressed in fat tissue (Acton *et al*, 1994), plasma levels of leptin and adiponectine were measured in null mice. Leptin is recognized as an important bone growth modulator (Fleet, 2000; Turner *et al*, 2013). Null females showed high plasma levels of leptin under fasting conditions as leptinemia was normal in *Scarb1*-null males, suggesting that leptin may explain the gender differences observed in bone status. Leptin is primarily produced by white adipose tissue and its plasma levels generally correlate with body fat. Though no difference in abdominal fat weight was noticed between WT and *Scarb1*-null females, greater *Lep* expression was observed in white adipose tissue from null females, implying alterations of adipocyte function. To note, the majority of adipocyte cholesterol originates from circulating lipoproteins (Yu *et al*, 2010). Since SR-BI is abundantly expressed in fat tissue and promotes cholesterol uptake from HDL (Tondu *et al*, 2005), cholesterol balance in *Scarb1*-null adipocytes may be deregulated. Such cholesterol imbalance is characteristic of hypertrophied adipocytes which translates to alterations of their metabolism and gene expression (Jernas *et al*, 2006; Le Lay *et al*, 2001, Yu *et al*, 2010).

Leptin has been demonstrated to promote HDL clearance (Lundasen *et al*, 2003) and defective HDL metabolism was reported in leptin-deficient (ob/ob) and leptin receptor deficient (db/db) mice (Silver *et al*, 1999; 2000), evoking that potential cross-talk between these 2 axes may occur. In accordance, leptin induces SR-BI expression in the liver of ob/ob mice (Lundasen *et al*, 2003). Of interest, estrogen increases SR-BI expression in adrenals and ovaries (Lopez and McLean, 2006). Furthermore, estrogen influences adipogenesis and adipose metabolism (reviewed in Mattsson and Olsson, 2007). Though no difference was observed in E₂ levels between WT and null females, the higher levels naturally occurring in females could induce disorders absent in males. Also, the transient nature of the higher bone mass observed in *Scarb1*-null females despite sustained high leptinemia may underlie an acquired leptin resistance phenomenon, perhaps through the modulation of leptin receptors as observed in models of age-related or diet-induced obesity (Martin *et al*, 2008). Furthermore, this phenotype may be stage-specific; as males tend to achieve peak bone mass later than females (Bonjour *et al*, 2009; Rizzoli *et al*, 2001; Stagi *et al*, 2013), we cannot discard this augmented bone mass might occur at another time-point. Further studies are warranted to determine how the absence of SR-BI alters the functions of adipocytes in female mice only and whether injection of leptin to male *Scarb1*-null mice mimics the bone phenotype of female *Scarb1*-null mice.

Although the altered endocrine condition in the female *Scarb1*-null mice likely exerts a significant influence on bone metabolism, we explored potential cellular defects in MSC. Our results indicate that *Scarb1*-null MSC from females displayed a greater proliferation rate, similar to null MSC from males (Martineau *et al*, 2014a); enhanced proliferation was also reported in SR-BI-deficient lymphocytes (Feng *et al*, 2011). Our data also indicate enhanced ALP activity and matrix mineralization, as well as enhanced gene expression of *Sp7* in MSC from *Scarb1*-null females, similarly to male mice (Martineau *et al*, 2014a). Therefore, intrinsic alterations of MSC correlate with the high bone mass phenotype of *Scarb1*-null mice. Moreover, we measured

reduced gene expression of *Sost* in null MSC from females, as observed in males. The *Sost* gene product sclerostin is a factor known to inhibit osteoblastic differentiation (Komori, 2013), and its down regulation in the absence of SR-BI also correlates with the bone phenotype of *Scarb1*-null mice.

Several studies argue that leptin decreases bone accrual through a hypothalamic relay (Fleet, 2000). In contrast, other studies rather suggest that leptin acts directly on OB and increases cell proliferation and differentiation; it has been proposed that peripheral leptin has anabolic bone effects, whereas its hypothalamic actions are catabolic (Motyl and Rosen, 2012). To determine whether *Scarb1* deficiency affected MSC response to this hormone, we verified the expression of *Colla1* and *Sp7*, two factors known to be induced by leptin exposure in OB (Gordeladze *et al*, 2002; Zhou *et al*, 2012). Both WT and null MSC showed increased *Colla1* gene expression in response to leptin, indicating that it promotes their osteoblastic differentiation. However, the induction of *Sp7* expression by leptin treatment was significant in the WT cells only due to its basal overexpression in null cells. Also, leptin treatment was without effect on *Sost* gene expression in null MSC due to its reduced basal expression. Thus, *Scarb1* deficiency does not overtly alter the response of MSC to ACTH or leptin but rather influences basal genic expression in these cells, seemingly rendering them less sensitive to these hormones' effects.

There is evidence in humans for gender-specific association of leptin with bone metabolism. Plasma leptin levels correlate positively with bone mass in women, as the opposite is noted in men (Weiss *et al*, 2006). Epidemiological studies also state a positive correlation between blood leptin levels and bone quality in non-obese premenopausal women (Cirmanova *et al*, 2008). Furthermore, gender differences of leptin function in bone development have also been suggested with higher leptin receptor expression in female *versus* male rats (Li *et al*, 2011). Moreover, subcutaneous leptin replacement in ob/ob mice resulted in increased trabecular bone

area mainly in lumbar vertebra and to a lower extent in femur (Turner *et al*, 2013). These data potentially explain why we observe enhanced bone formation in vertebrae and cortical bone of the female *Scarb1*-null mice; however, work remains to be done to understand why leptinemia is affected solely females.

3.7 Conclusions

We have associated SR-BI deficiency to higher vertebral and femoral bone mass in female mice, seemingly related to both systemic and cell-autonomous mechanisms. First, constitutively high plasma ACTH and leptin levels arguably account for an important part of the augmented bone mass. Second, adipose tissue metabolism seems to be altered in females only, leading to gender-specific leptin increases. Finally, MSC from *Scarb1*-null female mice show enhanced OB functions, which may also contribute to augmented bone mass.

3.8 Acknowledgements

Declaration of interest: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding: This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (RM: CIHR MOP-89958). CM is recipient of scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

Author contribution: Study design: LB and RM. Study conduct: CM and LM-F. Data collection: CM and LM-F. Data analysis: CM and RM. Data interpretation: CM and RM. Drafting manuscript: CM and RM. Revising manuscript content: CM, LB and RM. Approving final version of manuscript: CM, LM-F, LB and RM. RM takes responsibility for the integrity of the data analysis.

Table 3.1. Plasmatic parameters in fasted 2-month-old female mice.

Genotype		WT (5)	Null (5)
ALP	$\mu\text{mol p-NP}/(\text{L} \cdot \text{min})$	597.6 ± 47.9	521.3 ± 30.3
Ca	mg/dL	9.0 ± 0.5	9.0 ± 0.8
Pi	mg/dL	10.0 ± 0.7	10.2 ± 0.6
Ca x Pi⁽¹⁾	mg^2/dL^2	90.2 ± 11.5	91.7 ± 13.6
Glucose	mg/dL	227.9 ± 27.5	219.4 ± 20.7

Values are means \pm SEM; number of mice per group is indicated in parentheses.

(1) The Ca X Pi indices were obtained by multiplying the Ca and Pi means within each group, and their relative errors were added to obtain the absolute error of the product.

Table 3.2. MicroCT analysis parameter values in 2 and 4-month-old WT and null mice lumbar vertebrae.

	2 months		4 months	
	WT (13)	Null (13)	WT (12)	Null (12)
Female				
BV/TV (%)	32.7 ± 0.4	37.9 ± 0.7***	37.8 ± 1.6	37.3 ± 1.0
Tb.N (mm ⁻¹)	6.2 ± 0.1	7.0 ± 0.1**	6.3 ± 0.2	6.5 ± 0.1
Tb.Sp (μm)	150.5 ± 2.3	136.9 ± 2.2*	157.0 ± 5.4	164.7 ± 4.1
Tb.Th (μm)	55.2 ± 1.9	52.3 ± 1.9	65.1 ± 1.7	56.4 ± 1.1**
BMD (g/cm ³)	0.21 ± 0.01	0.28 ± 0.02*	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.01
Male				
	WT (12)	Null (10)	WT (12)	Null (12)
BV/TV (%)	35.9 ± 1.2	34.5 ± 1.0	35.0 ± 0.6	32.3 ± 0.8
Tb.N (mm ⁻¹)	6.6 ± 0.1	6.9 ± 0.3	6.0 ± 0.1	6.4 ± 0.1
Tb.Sp (μm)	130.7 ± 3.1	136.2 ± 5.9	146.4 ± 2.8	136.7 ± 3.0
Tb.Th (μm)	54.5 ± 2.3	50.6 ± 1.9	57.0 ± 1.4	49.7 ± 0.8*
BMD (g/cm ³)	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.06	0.21 ± 0.01

Values are mean ± SEM; number of mice per group is indicated in parentheses. Significant differences versus WT of corresponding age group: *P<0.05, **P<0.01, Bonferroni post-hoc test. Relative bone volume (BV/TV), number of trabeculae (Tb.N), trabecular spacing (Tb.Sp), trabecular thickness (Tb.Th), bone mineral density (BMD).

Table 3.3. Static and dynamic analyses parameter values in 2-month-old WT and null female and male mice vertebrae

	Female		Male	
	WT (8)	Null (7)	WT (6)	Null (7)
Single-labeled surface (%)	27.0 ± 2.3	36.8 ± 3.2*	30.1 ± 3.4	35.9 ± 2.4
Double-labeled surface (%)	15.0 ± 1.9	21.4 ± 1.0	11.5 ± 0.9	10.9 ± 1.1
Trabecular MAR (µm/d)	2.79 ± 0.21	3.62 ± 0.21*	2.71 ± 0.27	3.02 ± 0.19
MS/BS (%)	27.5 ± 2.8	33.1 ± 2.2**	23.9 ± 1.7	25.1 ± 1.4
Ob.S/BS (%)	22.3 ± 1.8	33.4 ± 3.1**	30.5 ± 2.2	27.5 ± 1.6
#Oc/mm	3.5 ± 0.2	3.9 ± 0.8	4.2 ± 0.3	4.6 ± 0.7
BFR/BS (µm ² /µm/d)	0.83 ± 0.12	1.15 ± 0.11*	0.63 ± 0.06	0.75 ± 0.07

Values are mean ± SEM; number of mice per group is indicated in parentheses. Significant differences versus WT: *P<0.05, **P<0.01, Bonferroni post-hoc test. Mineral apposition rate (MAR), mineralizing surface (MS/BS), relative osteoblast surface (Ob.S/BS), number of osteoclasts (#Oc/mm), bone formation rate (BFR/BS).

3.9 Figure legends

Figure 3.1. MicroCT and histological analysis of *Scarb1*-null mouse vertebrae.

(A) Representative 3D renderings of 2- and 4-month-old mouse 4th lumbar vertebrae bone volumes of interest (VOI) and representative 3D renderings of VOI. VOI was defined as a 230 slice thick section of the vertebral body (upper and lower dashed lines) selected 100 slices from the intervertebral space (IV, full line), caudal growth plate facing up. (B) Representative Von Kossa (VK, scale bar = 500 μ m), alkaline phosphatase (ALP, scale bar = 200 μ m), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP, scale bar = 200 μ m) stainings and calcein fronts (top: 10x digital zoom of typical double label front; bottom: general labeling, scale bar = 200 μ m) from lumbar vertebrae of 2-month-old mice.

Figure 3.2. Plasma cholesterol levels in fasted 2-month-old male and female WT and *Scarb1*-null mice.

Total, HDL-associated and LDL-associated cholesterol fractions from plasma were quantified the BioAssay systems Enzychrom kit. Values are means \pm SEM from 4 mice in each group. Significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) for WT vs null mice, 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test.

Figure 3.3. Serological analysis of the glucocorticoid (GC)/ACTH axis in 2- and 4-month-old WT and *Scarb1*-null female mice.

(A) Corticosterone and (B) ACTH levels were measured by ELISA in fasting (16h) and refed (2h) female mice. Values are mean \pm SEM; number of mice is indicated in parentheses. Significant difference (* $P < 0.05$) for fasted vs refed state and $\epsilon P < 0.05$ for WT vs null mice in refed condition, 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test. (C) GC/ACTH ratio obtained from the averages of datasets (A) and (B). Significant differences ($\epsilon P < 0.05$) for WT vs null mice in refed condition, 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test. (D) Differences between female and male mice for plasma levels of corticosterone (Δ GC) and ACTH (Δ ACTH) obtained

from the averages of datasets A and B for females, and data from the Martineau *et al.* 2014 study for males. Significant differences ($\epsilon P < 0.05$ and $\epsilon\epsilon\epsilon P < 0.001$) for WT vs null mice, 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test.

Figure 3.4. Estradiol plasma levels in WT and *Scarb1*-null mice.

Total estradiol levels were measured by ELISA in fasted 2 and 4-month-old female mice. Values are mean \pm SEM from five mice per group.

Figure 3.5. Plasma levels of leptin and gene expression of *Lep* in adipose tissue from WT and *Scarb1*-null mice.

(A) and (B) Plasma levels of leptin were measured by ELISA in fasting and refed WT and *Scarb1*-null mice. Values are mean \pm SEM; number of mice is indicated in parentheses. Significant differences when compared to fasted state ($*p < 0.05$) or compared to WT mice ($\epsilon P < 0.05$), 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test. (C) Leptin induction in refed mice from the averages of datasets (A) and (B). Significant differences ($*P < 0.05$) for WT vs null mice, 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test. (D) Gene expression of *Lep* in adipose tissue from 2-month-old WT and *Scarb1*-null mice. Values are mean \pm SEM; number of mice is indicated in parentheses. Significant difference ($\epsilon\epsilon P < 0.01$) vs WT mice, 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test.

Figure 3.6. Response of MSCs from WT and *Scarb1*-null mice to ACTH and leptin.

Real-time gene expression analysis of osteoblastic markers *Sp7* (A), *Colla1* (B) and *Sost* (C) without (CTL) or with addition of 10 nM ACTH or 100 ng/mL leptin to the culture medium for 24 h. Values are mean \pm SEM and number of cell preparations is indicated in parentheses. Significant differences when compared to CTL condition ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$) or compared to WT mice ($\epsilon p < 0.05$), 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc test.

Figure 3.1 MicroCT and histological analysis of *Scarb1*-null mouse vertebrae.

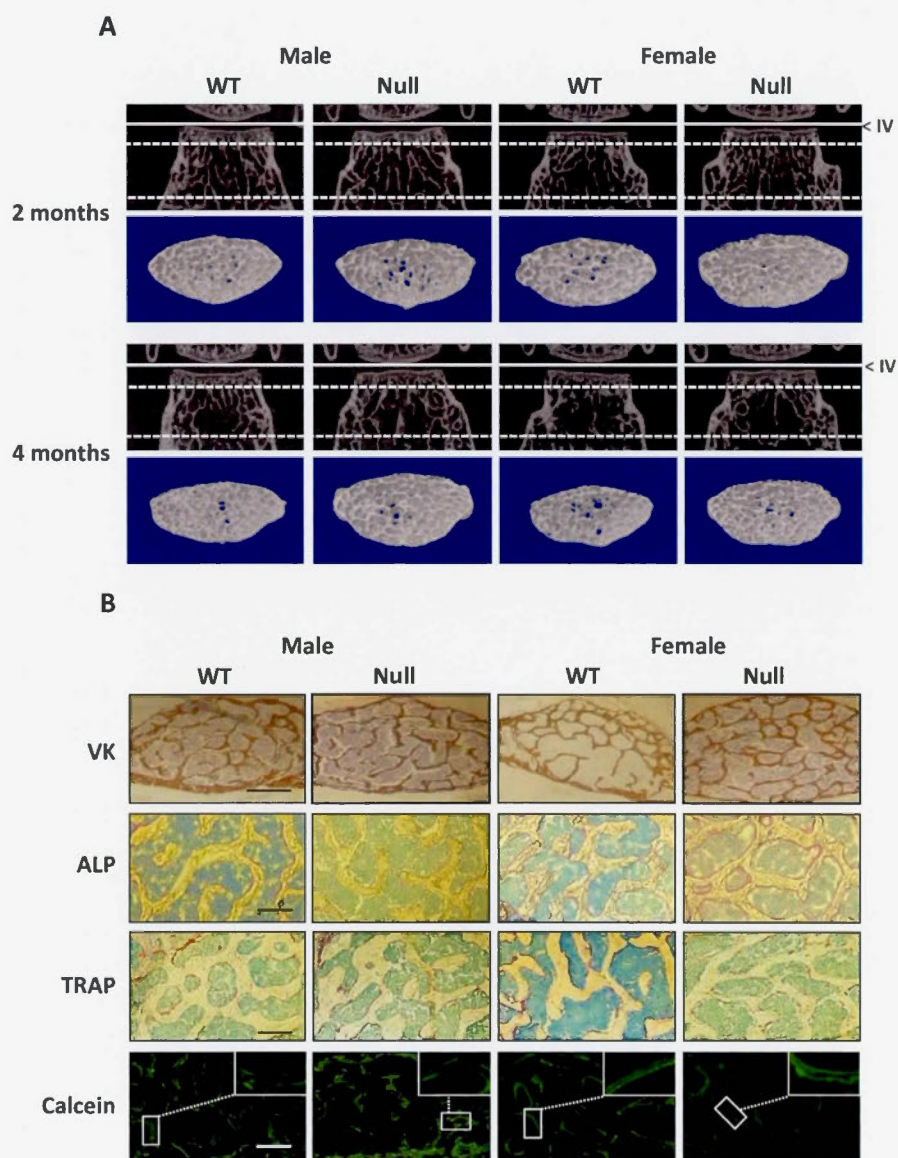


Figure 3.2 Plasma cholesterol levels in fasted 2-month-old male and female WT and *Scarb1*-null mice.

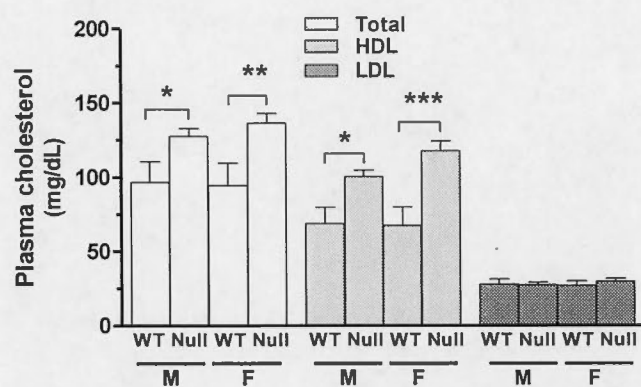


Figure 3.3 Serological analysis of the glucocorticoid (GC)/ACTH axis in 2- and 4-month-old WT and *Scarb1*-null female mice.

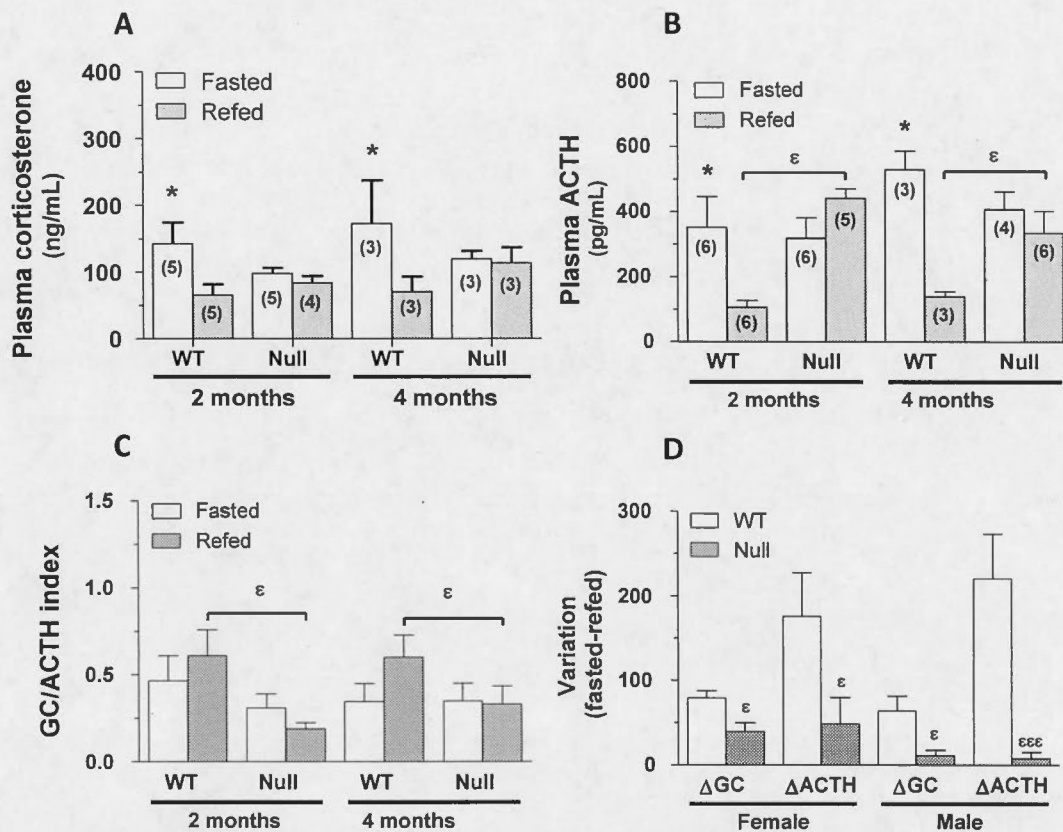


Figure 3.4 Estradiol plasma levels in WT and *Scarb1*-null mice.

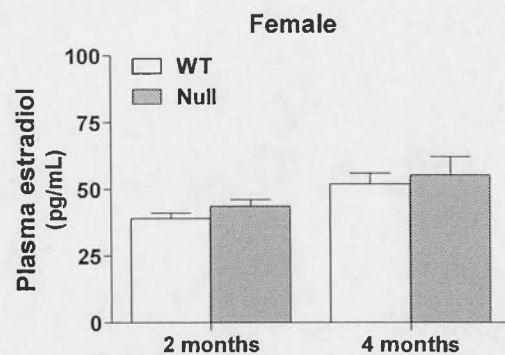


Figure 3.5 Plasma levels of leptin and gene expression of *Lep* in adipose tissue from WT and *Scarb1*-null mice.

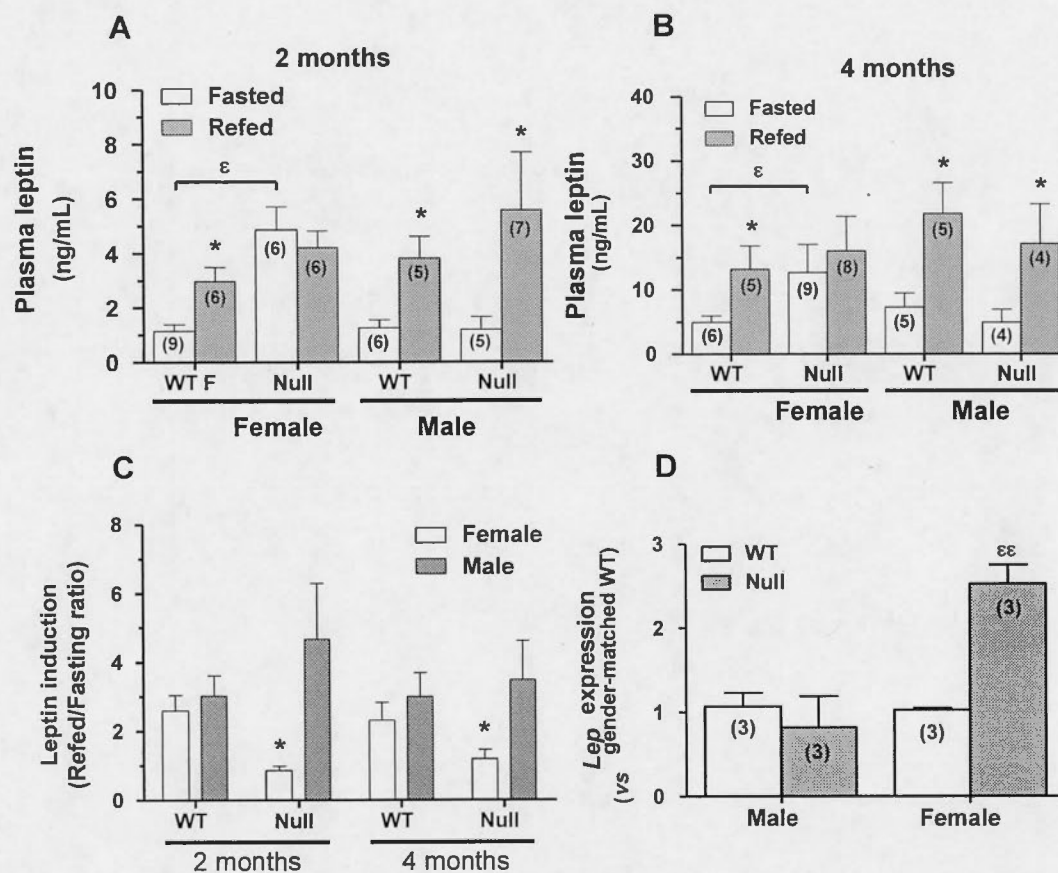
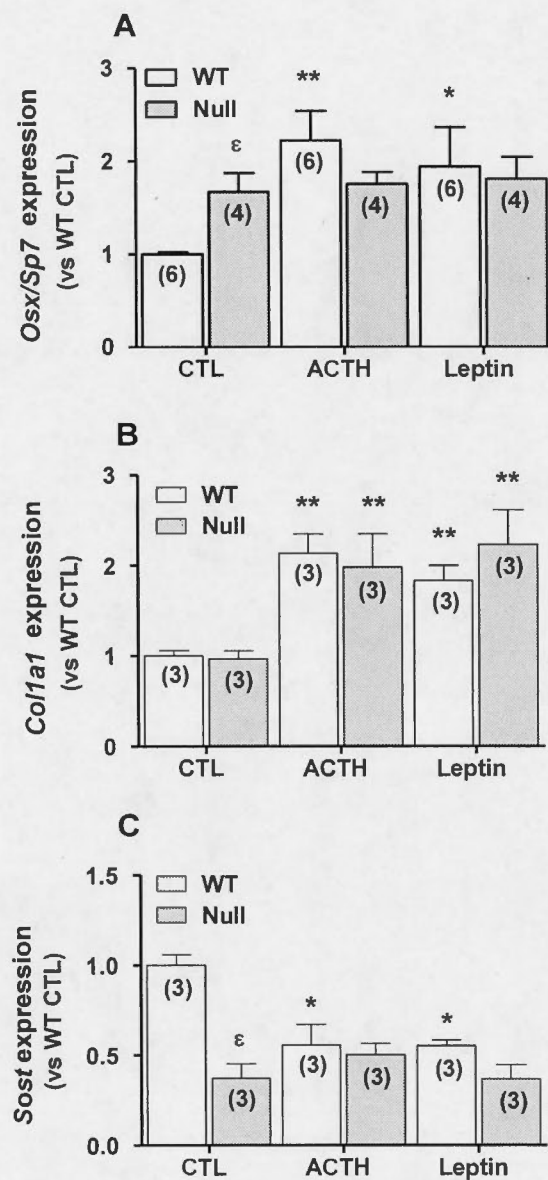


Figure 3.6
and leptin.

Response of MSCs from WT and *Scarb1*-null mice to ACTH



CHAPITRE IV

SCAVENGER RECEPTOR CLASS B, TYPE I (*SCARB1*) DEFICIENCY PROMOTES OSTEOLASTOGENESIS BUT STUNTS TERMINAL OSTEOCYTE DIFFERENTIATION

Corine Martineau¹, Olha Kevorkova¹, Louise Brissette², Robert Moreau^{1*}

¹Laboratoire du métabolisme osseux, ²Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines,
BioMed,

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal
Montréal, Qc, Canada, H3C 3P8

Physiological Reports, 2(10):e12117

Avant-propos

Ce troisième article est une étude *in vitro* des altérations fonctionnelles des MSC déficientes pour *Scarb1*; le but était de cerner les mécanismes spécifiques aux OB qui pourraient contribuer à la masse osseuse augmentée observée chez les souris déficientes pour *Scarb1 in vivo*. Pour faire suite aux résultats du chapitre II démontrant que la captation sélective à partir des HDL₃ n'est pas altérée en absence de SR-BI, nous avons ici démontré qu'en parallèle ni l'association lipidique/protéique, ni la liaison des HDL₃ n'était affectée dans les MSC déficientes pour *Scarb1*. De plus, le SR-BI ne semble pas participer à la cytotoxicité induite par les OxLDL. Par contre, son expression diminue graduellement lorsque les MSC sont soumises à un traitement ostéogénique. Après avoir confirmé la hausse de l'expression de *Scarb1* suite à une exposition aux HDL₃, nous avons démontré que celles-ci n'augmentent pas la prolifération des MSC; elles engendrent plutôt une baisse d'expression des cyclines. Parallèlement, l'expression de marqueurs ostéogéniques est diminuée suivant ce traitement; d'ailleurs, les os des souris déficientes pour *Scarb1* démontrent une densité réduite des ostéocytes. Parmi les autres gènes analysés, nous avons trouvé que plusieurs intermédiaires des voies canonique et noncanoniques des Wnt étaient surexprimés dans les MSC déficientes pour *Scarb1*; ces voies étant reconnues pour réguler la prolifération et la différenciation des OB, leur dérèglement pourrait être la clef des perturbations observées dans les OB déficients pour *Scarb1*.

Tous les échantillons ont été récoltés et analysés par Olha Kevorkova et moi-même, ainsi que toutes les manipulations en découlant. L'analyse et l'interprétation des résultats, ainsi que la rédaction de l'article ont été faits par Robert Moreau, Louise Brissette et moi-même. Cet article a été publié dans la revue *Physiological Reports*, ayant un facteur d'impact indéterminé en 2014.

4.1 Résumé

Le récepteur scavenger de classe B, type I (SR-BI), le produit du gène *Scarb1*, est un récepteur des lipoprotéines de haute densité (HDL) qui a été démontré pour influencer le métabolisme osseux. Son absence chez la souris est associée avec des altérations de l'axe hormonal des glucocorticoïdes/hormone adrénocorticotropique, et se traduit par une masse osseuse augmentée et une formation osseuse accentuée. Puisque les altérations cellulaires sous-jacentes à la hausse de la formation osseuse demeurent inconnues, nous avons étudié le comportement *in vitro* de cellules stromales issues de la moelle (MSC) de souris déficientes pour *Scarb1*. Aucune différence dans l'association/liaison des HDL₃, des esters de cholestérol (CE) ou de l'estradiol (E) n'a été mesurée entre les cellules déficientes pour *Scarb1* et celles contrôles (WT). L'expression génique de *Scarb1* est diminuée de moitié suivant un traitement ostéogénique. Ni la prolifération des cellules WT, ni celle des cellules déficientes, n'a été influencée par une exposition aux HDL₃, alors que cette condition a diminué l'expression génique du marqueur ostéoblastique ostérix (*Sp7*), et des marqueurs ostéocytiques sclérostine (*Sost*) et *dentin matrix protein 1* (*Dmp1*) indépendamment du génotype. L'expression basale de *Sost* et de *Dmp1* était de 40 % et 50 % celles des cellules WT; parallèlement, la densité d'ostéocytes était de 20 % inférieure dans les vertèbres de souris déficientes pour *Scarb1*. L'expression génique de co-récepteurs de la signalisation Wnt, notamment *LDL-related protein* (*Lrp*) 5 et *Lrp8*, est augmentée respectivement de 2 et 3, et celles des gènes-cibles transcriptionnelles *axis inhibition protein 2* (*Axin2*) et *lymphoid enhancer-binding factor 1* (*Lef1*) plus de 3 fois. L'expression génique de l'agoniste de la signalisation Wnt *Wnt5a* et de l'antagoniste *dickkopfs-related protein 1* (*Dkk1*) présentait une augmentation de 10 à 20 fois dans les cellules déficientes. Ces résultats suggèrent des altérations de la voie Wnt dans les MSC déficientes pour *Scarb1*, expliquant potentiellement leurs fonctions rehaussées, contribuant donc à la masse osseuse augmentée chez ces souris.

4.2 Abstract

Scavenger receptor class B type I (SR-BI), the *Scarb1* gene product, is a high density lipoprotein (HDL) receptor which was shown to influence bone metabolism. Its absence in mice is associated with alterations of the glucocorticoid/adrenocorticotrophic hormone axis, and translated in high bone mass and enhanced bone formation. Since the cellular alterations underlying the enhanced bone formation remain unknown, we investigated *Scarb1*-deficient marrow stromal cells (MSC) behavior *in vitro*. No difference in HDL₃, cholesteryl ester (CE) or estradiol (E) association/binding was measured between *Scarb1*-null and wild-type (WT) cells. *Scarb1* genic expression was down-regulated 2-fold following osteogenic treatment. Neither WT nor null cell proliferation was influenced by HDL₃ exposure whereas this condition decreased genic expression of osteoblastic marker osteonectin (*Sp7*), and osteocyte markers sclerostin (*Sost*) and dentin matrix protein 1 (*Dmp1*) independently of genotype. *Sost* and *Dmp1* basal expression in null cells was 40 % and 50 % that of WT cells; accordingly, osteocyte density was 20 % lower in vertebrae from *Scarb1*-null mice. Genic expression of co-receptors for Wnt signaling, namely LDL-related protein (*Lrp*) 5 and *Lrp8*, was increased respectively by 2- and 3-fold, and of transcription target-genes axis inhibition protein 2 (*Axin2*) and lymphoid enhancer-binding factor 1 (*Lef1*) over 3-fold. Gene expression of Wnt signaling agonist *Wnt5a* and of the antagonist dickkopf-related protein 1 (*Dkk1*) were found to be increased 10- to 20-fold in null MSC. These data suggest alterations of Wnt pathways in *Scarb1*-deficient MSC potentially explaining their enhanced function, hence contributing to the high bone mass observed in these mice.

4.3 Introduction

Scavenger receptor class B, type I (SR-BI), the protein product of the *Scarb1* gene, is a high affinity high density lipoprotein (HDL) receptor (Acton *et al*, 1996) known for its role in the process of reverse cholesterol transport (RCT), e.g. the transport of cholesterol from peripheral tissues towards the liver for excretion (Zhang *et al*, 2005a). RCT implies the cholesterol efflux from cells to HDL and the selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters (HDL-CE) by hepatic SR-BI and therefore, this receptor's functions are considered beneficial to the cardiovascular system (Mineo and Shaul, 2012). Its absence correlates with impaired HDL cholesterol metabolism (Rigotti *et al*, 1997) and reduced HDL-CE selective uptake (Brodeur *et al*, 2005). In accordance, *Scarb1*-null mice display increased HDL-associated cholesterol which agrees with its role in HDL metabolism (Rigotti *et al*, 1997). The process of HDL-CE selective uptake is also preponderant in steroidogenic organs, such as ovaries and adrenal glands, where it supplies cholesterol molecules for steroid synthesis (Hoekstra *et al*, 2009; Rigotti *et al*, 2003). Additional functions of SR-BI include selective uptake of other HDL-associated lipophilic compounds by cells, such as estradiol (Badeau *et al*, 2007) and vitamin E (Mardones *et al*, 2002). Since SR-BI has been shown to be expressed in macrophages (Hirano *et al*, 1999), and to bind and mediate internalization of oxidized low-density lipoproteins (OxLDL) (Gillotte-Taylor *et al*, 2001), it has been postulated that OxLDL uptake accounts for macrophage foam cell formation in atherosclerotic lesions. Though its role in the liver and steroidogenic tissues is well established, its functions in peripheral tissues are not clear. In enterocytes, SR-BI is thought to promote cholesterol absorption (Altmann *et al*, 2002; Levy *et al*, 2007). In adipocytes, this receptor is associated with HDL clearance and subsequent efflux of adipose-stored cholesterol to HDL, contributing to HDL cholesterol homeostasis (Yvan-Charvet *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2010).

We have reported expression of SR-BI and selective uptake of HDL-CE and estradiol by osteoblasts (OB) (Brodeur *et al*, 2008c). These cells contribute to the remodeling of bone tissue which relies on the activities of bone-forming OB and bone-resorbing osteoclasts (OC), to maintain bone mass (Clarke, 2008). We recently reported that *Scarb1*-null mice show high femoral bone mass associated with enhanced bone formation (Martineau *et al*, 2014a), suggesting that SR-BI contributes to the regulation of bone metabolism. Since *Scarb1*-null mice show high HDL-associated cholesterol levels (Rigotti *et al*, 1997; Martineau *et al*, 2014a; 2014b), whether the high plasma HDL-associated cholesterol levels observed in these mice contribute to the enhanced bone formation and high bone mass remained unknown. Studies focusing on the relationship between HDL and bone have yielded conflicting results; some associate higher plasma HDL levels to higher bone mass, while others have found no or inverse correlations (reviewed in Ackert-Bicknell, 2012). Interestingly, we have evidenced that selective uptake levels of HDL-CE and HDL-associated estradiol were similar between mesenchymal stromal cells (MSC) from wild-type (WT) and *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a), suggesting that its contribution to this process is not its main role in these cells. On the other hand, intrinsic alterations of MSC functions from *Scarb1*-null mice were evidenced *in vitro*, globally showing enhanced bone-forming potential such as increased proliferation rate, higher alkaline phosphatase activity, enhanced matrix mineralization and higher genic expression of the osteoblastic transcription factor *Sp7* (Martineau *et al*, 2014a; 2014b).

Of interest, we measured lower caveolin-1 (*Cav1*) expression in MSC from *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a). Caveolin-1 is a membrane protein whose expression is sufficient to generate the formation of flask-shaped membrane structures termed caveolae (Parton *et al*, 2006). Caveolae are involved in several cellular pathways, either repressing or enhancing their signal through interactions with different receptors and intermediates (Cohen *et al*, 2004; Razani *et al*, 2002).

Because of its importance in numerous signaling pathways, disruption of *Cav1* expression is expected to cause cellular disorders; for example, it is known to repress cyclin D1 expression and to keep cells in a quiescent state (Galbiati *et al*, 2001; Hult *et al*, 2000). Though the exact mechanisms remain to explore, caveolin-1 is also reported to regulate human MSC proliferation and differentiation towards an osteoblastic phenotype (Baker *et al*, 2012). Since similar alterations in *Scarb1*-null mouse MSC were previously reported (Martineau *et al*, 2014a), similar mechanisms may be at play. Of note, some receptors of canonical Wnt signaling, a pathway involved in osteoblastogenesis (Boudin *et al*, 2013), have been localized in caveolae, such as LRP6 (Yamamoto *et al*, 2006) and LRP8 (Riddell *et al*, 2001). The aims of this study were to further document the impact of *Scarb1* deficiency on MSC functions *in vitro*.

4.4 Material and methods

4.4.1 Experimental animals

Scarb1-null (-/-) mice on a C57BL/6 background were purchased from Jackson laboratories (stock #003379; Bar Harbor, ME, USA) and cross-bred with WT C57BL/6 mice. Heterozygous (HZ) littermates (initial parental couples, P0) were bred to yield first generation (F1) WT and null mouse pairs; since null females show low fertility, higher reproduction rates were achieved by feeding *Scarb1*-null females a 0.5 % Probucol diet (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) prior to mating (Miettinen *et al*, 2001). HZ couples were bred in parallel with WT and null couples through each generation to allow direct WT and null littermate comparison. Null pup yield from HZ pairs being below 20 %, null mice of F10 to F12 generations from both HZ and null pairs were pooled together and compared to appropriately matched WT groups. All individuals were kept in a 12 h/12 h day/night cycle with free access to food and water unless specified otherwise. All animal protocols were performed according to the UQÀM Institutional Animal Care Committee (IACC #757).

4.4.2 Culture of bone-marrow stromal cells

Long bones from 2-month-old male and female mice hind legs were harvested and sterilized in phosphate-buffered saline (PBS) containing 200 U/mL penicillin, 200 µg/mL streptomycin and 1 % FungiZone (all from Invitrogen, Burlington, Ont., Canada). Epiphyses were cut off under sterile hood and marrow was flushed out. Bone-marrow cells were suspended in alpha Minimum Essential Medium Eagle (αMEM; Invitrogen) supplemented with 100 U/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin, L-glutamine, 10 % fetal bovine serum (North Bio, Toronto, Ont., Canada), 25 µg/mL L-ascorbic acid (Sarstedt, Montreal, Qué., Canada) and plated; bones from 1 mouse were used per 100 mm culture dish (Sigma-Aldrich). The cells were left to adhere for 7 days, and thoroughly washed with PBS to eliminate non adherent cells. Adherent cells (hereafter referred to as marrow stromal cells – MSC)

were harvested at confluence for experimentation. Cells harvested from each mouse were considered as an independent biological replicate; since cells from males and females showed the same profile, the data were pooled for statistical purposes.

4.4.3 Preparation of lipoproteins

Lipoproteins were isolated from human plasma (Bioreclamation, Hicksville, NY, USA). Before isolation, plasma was supplemented with 0.01 % EDTA, 0.02 % sodium azide, and 10 μ M phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) to prevent degradation. Human HDL₃ (density of 1.125–1.21 g/mL) and LDL (density of 1.025–1.063 g/mL) were prepared by ultracentrifugation as described previously (Brissette *et al*, 1996; Brodeur *et al*, 2008c). HDL₃ and LDL were dialyzed twice for 24 h to remove EDTA; LDL were further incubated with 5 μ M CuSO₄ for 20 h at 30 °C as described previously (Brodeur *et al*, 2008a; 2008b; Lougheed and Steinbrecher, 1996). Oxidation was stopped by addition of 100 μ M EDTA and 40 μ M butylated hydroxytoluene (BHT). Oxidized LDL particles (OxLDL) were dialyzed twice more and concentrated to 10–15 mg/mL using Centriplus-100 ultrafiltration devices (Amicon, Oakville, Ont., Canada).

4.4.4 Association and binding assays

HDL₃ were radiolabeled as described previously (Brissette *et al*, 1996; Brodeur *et al*, 2008c) either through 125-iodination, with 1,2-[³H]cholesteryl oleate (CO) (Roberts *et al*, 1985) or [2,4,6,7,16,17-³H]estradiol (E₂). The specific activity for each ligand ranged between 65,000 to 105,000 cpm/ μ g protein for [¹²⁵I]-HDL₃, 18,000 to 18,300 cpm/ μ g protein for [³H]-CO-HDL₃ and 5,500 to 5,800 cpm/ μ g protein for [³H]-E₂-HDL₃. Cellular associations of ¹²⁵I-lipoprotein or [³H]CO- or [³H]E₂-HDL₃ were conducted as previously described (Brodeur *et al*, 2008c; Martineau *et al*, 2014a). Cellular binding of ¹²⁵I-lipoprotein was measured using the same lipoprotein concentrations as association experiments, but were rather incubated at 4 °C for 2 h to insure no cell metabolic activity or ligand internalization. After the incubation, cells

were washed twice with 1mL PBS containing 0.2 % BSA, followed by two washes with 1mL PBS, and solubilized in 1.5 mL of 0.2 N NaOH. Radioactivity counts in the homogenates were obtained with a cobra II γ -counter (Canberra-Packard) for ^{125}I -HDL₃ determination and with a β -counter (Wallack-Fisher) for measurement of [^3H]CO- or [^3H]E₂-HDL₃ content. The results are expressed in micrograms of lipoprotein protein per milligram of cellular protein. Cellular protein contents were determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

4.4.5 MTT activity and proliferation assays

MTT activity was determined in 96-well plates (Sarstedt) by microtiter tetrazolium assay after incubation. Briefly, MTT reagent was added to the median at a final concentration of 0.5 mg/mL. Four hours later, formazan crystals generated by cellular reduction of the MTT reagent were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 30 min at 37 °C and the absorbance was determined at 575nm. Results are expressed as the relative MTT activity of treated versus control conditions.

4.4.6 Osteogenic differentiation treatment

MSC were seeded in 6-well plates at 50,000 cells/cm² and cultured to confluence; monolayers were then treated 3 times a week with control (MEM supplemented with 10% FBS) or osteogenic medium (control medium supplemented with 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid and 5 mM glycerol-2-phosphate) for 3 weeks. After the treatment, differentiation was assessed by ALP and ARS staining as described elsewhere (Martineau *et al*, 2014a) in half of the wells; the other wells were used to observe genic expression of *Scarb1*.

4.4.7 Osteocyte density

Following CO₂ euthanasia, lumbar vertebrae from 10 week old mice of both genotypes were harvested, fixed overnight in 4 % paraformaldehyde at 4 °C and processed to be paraffin-embedded. Bones were decalcified for 14 days in 10 %

EDTA-PBS prior to processing. Vertebrae were sectioned at a 10 μ m thickness with a HM360 rotary microtome (Thermofisher) and mounted on SuperFrost Plus glass slides (Thermofisher). Sections were heated flat at 60 °C for 10 min; tissues were then deparaffinised and rehydrated. The sections were rinsed 3x5min in PBS stained with DAPI (Invitrogen), mounted with ProLong (Invitrogen) and visualized with a FC1 Eclipse inverted fluorescence microscope (Nikon) using a 20X wide-field objective (Nikon). The osteocyte (OS) density was evaluated as the number of DAPI-positive cells per mm² bone matrix area using the ImageJ software.

4.4.8 Real-time PCR analysis

Total RNA from MSC was extracted using RiboZol (Amresco, Solon, OH, USA) following manufacturer's instructions. One μ g of RNA was reversed transcribed with AMV reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Laval, Que., Canada) and the resulting complementary DNA was used for PCR on a MyiQ thermal cycler (BioRad, Mississauga, Ont., Canada). Semi-quantitative PCR screening was performed with the Qiagen PCR Core kit according to manufacturer's instructions with the primers detailed in Table 4.1. The PCR products were visualized following electrophoresis on a 2 % agarose gel stained with GoGreen (Invitrogen). Real-time relative quantification was performed using SYBR Green (BioRad). Primers specific for the genes of interest detailed in Table 1 were used, and the PCR were run for 40 cycles with an annealing temperature of 58 °C for 30 sec. The expression of each gene was normalized to *B2m*, and then expressed as a KO to WT ratio. The relative fluorescence units (RFUs) were analyzed with the iQ5 software (BioRad).

4.4.9 Statistical analysis

Statistical analyses were conducted with the Prism5 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Paired t tests, 2-way ANOVAs and Bonferroni post hoc tests, as indicated in the legend, were applied to determine statistical significance; a P value of 0.05 was considered as the significance threshold. All data are presented as mean \pm SEM.

4.5 Results

4.5.1 Impact of SR-BI deficiency on HDL₃ association and binding, and OxLDL cytotoxicity in MSC

Our previous results indicated that selective uptake of CE and estrogen from HDL₃ was similar between WT and *Scarb1*-null MSC (Martineau *et al*, 2014a). Since SR-BI is a high affinity receptor for HDL (Acton *et al*, 1996), we further investigated association and binding of HDL₃ in MSC. As shown in Fig. 4.1A, neither lipoprotein, lipid and estrogen association, nor lipoprotein binding were different between WT and *Scarb1*-null MSC. Since SR-BI has also been shown to bind and mediate internalization of OxLDL (Gillotte-Taylor *et al*, 2001), we determined the OxLDL-induced cytotoxicity in MSC from *Scarb1*-null mice. Incubation of WT MSC with increasing OxLDL concentrations resulted in a dose-dependent reduction in cell viability (Fig. 4.1B), agreeing with previous findings (Brodeur *et al*, 2008a; Hamel *et al*, 2008). Of interest, OxLDL induced similar cytotoxicity in *Scarb1*-null MSC (Fig. 4.1B), suggesting that this receptor is not the main contributor to OxLDL-induced cell death. Since absence of this receptor was associated to enhanced MSC functions (Martineau *et al*, 2014a; 2014b), *Scarb1* expression was monitored throughout osteogenic treatment to assess its role in OB. *Scarb1* gene expression was found to be down-regulated with osteogenic differentiation (one-way ANOVA, $p < 0.05$), hinting at a possible repressive role in MSC proliferation and/or osteoblastic differentiation (Fig. 4.1C).

4.5.2 Contribution of HDL and SR-BI to regulation of MSC proliferation and differentiation

We recently reported enhanced proliferation of *Scarb1*-null MSC (Martineau *et al*, 2014a; 2014b). Also, reports on the modulation of cell proliferation by HDL are numerous (Kothapalli *et al*, 2004; Xu *et al*, 2012a; Yvan-Charvet *et al*, 2010). Since *Scarb1*-null mice display increased HDL levels, we therefore investigated the effects of HDL and the involvement of SR-BI in MSC proliferation. As shown in Fig. 4.2A,

Scarb1 expression was increased by incubation of WT MSC with HDL₃, a subclass of HDL rich in apoA-I and binding more specifically to SR-BI (Rigotti *et al*, 1997), which agrees with our previous results in MG-63 OB-like cells (Brodeur *et al*, 2008b). However, neither the addition of HDL₃ nor LDL significantly modified proliferation in WT or null cells (Fig. 4.2B), in spite of the greater proliferation in complete medium observed in the null cells. Accordingly, null MSC showed significantly higher gene expression of cell cycle regulators cyclin A2 (*CcnA2*) and cyclin D1 (*CcnD1*) under control conditions, yet HDL₃ exposure reduced their expression in both WT and null cells (Fig. 4.2C).

4.5.3 Impact of HDL₃ on osteogenic markers in WT and *Scarb1* null MSC

Because HDL₃ did not promote proliferation in neither WT nor null MSC, we investigated whether these conditions would influence the expression of osteogenic markers. We previously reported that *Scarb1*-null MSC show enhanced osteoblastic differentiation (Martineau *et al*, 2014a; Martineau *et al*, 2014b). In accordance, *Runx2* and *Sp7* expression was increased in *Scarb1*-null MSC under control culture conditions (Fig. 4.3A and B). Moreover, *Sp7* expression was significantly reduced by HDL₃ exposure in both genotypes, whereas no effect was noticed on *Colla1* expression (Fig. 4.3B). Both *Sost* and *Dmp1* osteocyte markers were significantly less expressed in the null cells (Fig. 4.3C); moreover, both *Sost* and *Dmp1* expression was reduced by HDL₃ exposure in the WT cells, while no significant difference was observed in their expression in *Scarb1*-null cells. Findings of reduced osteocyte marker expression in *Scarb1*-null cells *in vitro* prompted us to measure the number of osteocytes in bone sections from *Scarb1*-null mice. Nuclear DAPI staining of lumbar vertebrae sections for osteocytes, e.g. cells buried within bone matrix (Fig. 4.3D), showed lower osteocyte density in the null bones compared to WT bones (Fig. 4.3E), agreeing with the lower expression of osteocyte markers. Furthermore, *Scarb1*-null cells express lower levels of *Ocn* mRNA (Fig. 4.3F).

4.5.4 Enhanced canonical and noncanonical Wnt signaling in *Scarb1*-null MSC

Since no clear correlation could be established between the *in vitro* cell behavior of *Scarb1*-null MSC and either SR-BI binding affinity or HDL effects in MSC, we investigated whether other pathways may be deregulated in the null cells. We previously measured lower *Cav1* expression in MSC from *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a). Since components of the canonical Wnt signaling pathway have been localized in caveolae (Yamamoto *et al*, 2006; Riddell *et al*, 2001) and that this signaling pathway is involved in osteoblastogenesis (Boudin *et al*, 2013), we investigated potential alterations of the latter in *Scarb1*-null MSC. A real-time relative genic expression screening indicated overexpression of the *Lrp5* and *Lrp8*, while *Lrp1* remained unaffected (Fig. 4.4A). Moreover, *Lef1* and *Axin2*, known transcription-targets of the Wnt signaling pathway, were also overexpressed in *Scarb1*-null MSC (Fig. 4.4B). Further exploration also showed significant overexpression of the noncanonical pathway ligand *Wnt5a* and canonical pathway inhibitor *Dkk1* (Fig. 4.4C); despite a visible trend, the apparent reduction in *Wnt3a* and *Rspo2* expression was not statistically significant.

4.6 Discussion

SR-BI, the gene product *Scarb1*, is an HDL receptor whose function in lipoprotein metabolism is well known. However, its role in peripheral tissues is unclear and does not always seem to correlate with its selective uptake functions. We previously reported higher bone mass in *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a; 2014b). Though these mice show high HDL-associated cholesterol levels (Rigotti *et al*, 1997; Martineau *et al*, 2014a; 2014b), whether their high plasma HDL-associated cholesterol contribute to the enhanced bone formation remains unknown. On the other hand, intrinsic alterations of MSC functions from *Scarb1*-null mice were evidenced *in vitro*, globally showing enhanced bone-forming potential (Martineau *et al*, 2014a; 2014b). We report herein that *Scarb1* deficiency impacts neither HDL and associated lipids association or binding, nor MSC sensitivity to OxLDL. Secondly, HDL₃ do not promote MSC proliferation and repress osteogenic marker expression in both genotypes. Finally, *Scarb1* deficiency seemingly stunts terminal osteocytic differentiation and alters gene expression of several actors of Wnt signaling.

Since SR-BI is a high affinity receptor for HDL₃, we verified whether some alterations in the association or binding capacities between WT and null cells occurred. No significant difference in lipid ligand or HDL₃ association/binding was evidenced between WT and null MSC. These findings confirm our previous results showing unchanged levels of selective uptake of E₂ and CO from HDL₃ in WT and *Scarb1*-null MSC (Martineau *et al*, 2014a). These data state that SR-BI is not the sole receptor involved in the selective uptake process in MSC and that other receptors are able to associate to lipid ligands and bind HDL₃ in these cells. It is possible that the cluster of differentiation-36 (CD36), a member of the SR-B family, could rescue SR-BI deficiency for HDL-CE selective uptake as we have shown for LDL-CE selective uptake in mouse liver (Luangrath *et al*, 2008). Moreover, other receptors such as LRP

have been shown to participate in the selective uptake of lipids from HDL (Vassiliou *et al*, 2001).

We have previously reported OxLDL-induced cytotoxicity in osteoblastic cells (Brodeur *et al*, 2008a; Hamel *et al*, 2008), yet the identity of the involved receptor(s) remains unknown. Since SR-BI binds and internalizes OxLDL (Gillotte-Taylor *et al*, 2001), we determined the OxLDL-induced cytotoxicity in *Scarb1*-null MSC. Oxidized LDL induced similar cytotoxicity in both genotypes, rendering a significant contribution of SR-BI unlikely. Other receptors bind OxLDL and therefore, OxLDL-induced cytotoxicity probably involves several different mechanisms independent of SR-BI. Namely, the scavenger receptors class A (SR-A) as well as CD36 are expressed by OB (Brodeur *et al*, 2008c; Kalajzic *et al*, 2005) and are known to participate in the internalization of OxLDL in macrophages, promoting their transformation into foam cells. Though being involved neither in HDL₃ binding/association nor OxLDL-induced cytotoxicity, *Scarb1* expression was significantly reduced in MSC undergoing osteogenic treatment; to assess whether this gene could be involved in HDL-mediated regulation of cell functions, we further investigated proliferation and differentiation markers following HDL₃ treatment.

Enhanced proliferation of *Scarb1*-null MSC in control conditions was revealed by increased MTT activity in complete medium and augmented gene expression of *CcnA2* and *CcnD1*, which encode cyclins promoting cell cycle progression towards the S and G2/M phases, respectively (Meeran and Katiyar, 2008). Of note, we reported that gene expression of *Cav1* is reduced in *Scarb1*-null MSC (Martineau *et al*, 2014a). Its gene product caveolin-1 is known to repress transcription of *CcnD1* in smooth muscle cells and heart tissue (Hulit *et al*, 2000; Nagajyothi *et al*, 2006) and *CcnA2* in fibroblasts and smooth muscle cells (Kim *et al*, 2005); *Cav1* expression is down-regulated by proliferative stimuli such as FGF or PDGF (Hulit *et al*, 2000). *Scarb1* therefore seems to be a negative regulator of proliferation by keeping MSC in

G0/G1 quiescent phase, as SR-BI has been linked to stabilization of caveolin-1 expression (Frank *et al*, 2002), supporting our findings. Accordingly, enhanced proliferation was reported in *Cav1* KO mouse embryonic stem cells (Razani *et al*, 2001) and human MSC following *Cav1*-targeted gene silencing (Baker *et al*, 2012). We next investigated whether HDL₃ impact MSC proliferation. *Scarb1* expression is induced following HDL₃ exposure as we previously reported in MG-63 OB-like cells (Brodeur *et al*, 2008b); however, our data indicate that HDL₃ has no effect on MSC proliferation as evidenced by MTT assays and lower mRNA levels of *CcnA2* and *CcnD1*. Moreover, the reduction of *CcnA2* and *CcnD1* expression was observed in both genotypes, suggesting an SR-BI-independent mechanism. These results diverge from the study of Xu *et al* (2012a) demonstrating that HDL-induced proliferation of rat MSC was prevented by *Scarb1*-targeted gene silencing. Discrepancy between these results and ours may arise from species differences and experimental procedures. In mice, HDL are reported to inhibit proliferation in hematopoietic stem/progenitor cells through an ATP-binding cassette transporter A1 and G1 (ABCA1/G1)-dependent mechanism (Feng *et al*, 2012; Yvan-Charvet *et al*, 2010), which may be at play in our model. Also, Xu *et al* (2012a) treated MSC with an HDL₂/HDL₃ mix in 2% FBS. We rather use HDL₃, because of its greater selectivity towards SR-BI binding (Rigotti *et al*, 1997), and lipoprotein-deficient serum to avoid confounding effects from bovine lipoproteins present in serum. Moreover, a similar study reported that HDL did not promote rat MSC proliferation (Xu *et al*, 2012b).

Since HDL₃ do not promote MSC proliferation in our system, we therefore questioned whether they influenced osteogenic marker expression. We have previously reported higher levels of *Sp7* yet normal levels of *Colla1* mRNA in *Scarb1*-null MSC (Martineau *et al*, 2014a), which was confirmed in the present study with the measurement of increased *Runx2* expression in *Scarb1*-null MSC. Exposure to HDL₃ had no impact on gene expression of *Colla1* but reduced *Sp7* gene expression; this effect seemed independent of SR-BI since observed in both WT and

null cells. Interestingly, gene expression of *Sost* and *Dmp1* was reduced in *Scarb1*-null MSC; accordingly, lower osteocyte density was observed in null mouse vertebrae. Osteocytes are expected to inhibit osteoblast proliferation and differentiation through secretion of SOST, encoded by the *Sost* gene (Komori, 2013). Of interest, *Sost* overexpression in osteoblasts prevents load-induced activation of Wnt signaling (Tu et al, 2012); moreover, disruption of *Cav1* expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells reduces their mechanical response and survival (Gortazar et al, 2013). The reduction of *Sost* expression in *Scarb1*-null MSC may be relevant, as its protein product is known to inhibit Wnt signaling and repress osteoblast proliferation and differentiation (Boudin et al, 2013; Komori, 2013). Also, our data indicate that HDL₃ reduced *Sost* and *Dmp1* expression in WT MSC; thus, though *Scarb1* deficiency itself promotes osteogenic differentiation of MSC, HDL₃ treatment shows differential effects on osteogenesis by reducing *Sost/Dmp1* and *Sp7* simultaneously. Accordingly, we observed higher *Runx2* and lower *Ocn* expression in the null cells relatively to the WT cells; the transgenic overexpression of *Runx2*, isoform I, has been demonstrated to reduce *Ocn* gene transcription, yet no effect on *Colla1* expression was observed (Kanatani et al. 2006), as we observed in our previous study (Martineau et al, 2014a). Moreover, overexpression of either *Runx2* isoforms reduces osteocyte density (Kanatani et al, 2006), similarly to what is observed in the current study. However, Kanatani et al. (2006) also reported lower trabecular bone volume and cortical thickness in these mice, quite opposite to what our model displays; perhaps the degree of *Runx2* overexpression in *Scarb1*-null mice, much lower than that in the *Runx2*-transgenic line generated by Kanatani et al (2006), is not sufficient to provoke detrimental effects on bone structure yet enough to induce some imbalance in cells from the osteoblastic lineage.

Because lower *Sost* expression in *Scarb1*-null cells hinted at a possible alteration of Wnt signaling, we verified whether this pathway was affected. Several actors of canonical Wnt pathway were overexpressed in *Scarb1*-null MSC, such as *Lrp5* and

Lrp8 which encode co-receptors in Wnt signaling, as well as *Axin2* and *Lef1* that are transcription-targets of this pathway. The Wnt pathway regulates proliferation and differentiation of osteoprecursors (Boudin *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2012b) namely through upregulation of *CcnD1* gene expression by *Lef1*, leading to enhanced cell proliferation (Shtutman *et al*, 1999; Tu *et al*, 2012) and corroborating the higher expression of this gene in null cells. Since SOST is recognized to bind LRP5/6 and antagonize the canonical Wnt pathway (Li *et al*, 2005), its lower expression in *Scarb1*-null MSC could promote Wnt signaling. Moreover, the *Lrp5* gene promoter contains *Runx2* response elements (Agueda *et al*, 2011), the latter promoting osteogenesis; perhaps the enhanced *Lrp5* expression in *Scarb1*-null cells is linked to greater *Runx2* activity. Also, LRP8 was recently shown to be important in canonical Wnt signaling (Zhang *et al*, 2012b); its overexpression in *Scarb1*-null cells also agrees with enhanced osteogenic potential. Moreover, we report that *Wnt5a* is overexpressed in *Scarb1*-null MSC, suggesting overactivation of the noncanonical Wnt pathway as well. Considering that this pathway antagonizes canonical Wnt signaling in some systems (Davis *et al*, 2008), this may reflect a mechanism to re-establish balance in the *Scarb1*-null cells. The overexpression of *Dkk1* also speaks in that direction, since this factor prevents β -catenin accumulation necessary for canonical Wnt signaling (Boudin *et al*, 2013). Paradoxically, high *Dkk1* osteoblast-targeted overexpression is associated with lower bone mass (Yao *et al*, 2011). Nevertheless, patients with sclerostin deficiency (sclerosteosis and van Buchem disease) show increased bone formation despite significantly higher DKK1 plasma levels (van Lierop *et al*, 2014), which suggests an adaptative response to increased bone formation characterizing these diseases although high DKK1 levels do not compensate for the lack of sclerostin. Moreover, some rare metabolic diseases such as Schnitzler Syndrome are associated to high DKK1 plasma levels yet higher bone mass (Terpos *et al*, 2012). The reason why *Scarb1*-null mice show greater osteoblastic surface (Martineau *et al*, 2014a; 2014b) yet fewer OS remains speculative. Perhaps *Scarb1* deficiency disrupts the terminal OS differentiation of

MSC, keeping them in a “post-OB/pre-OS” state. Reduced OS density along with lower *Sost* and *Dmpl* expression agree with the enhanced OB surface *in vivo* and enhanced bone formation reported in *Scarb1*-null mice (Martineau *et al*, 2014a; 2014b).

4.7 Conclusions

Herein we report that *Scarb1*-null MSC spontaneously show greater proliferation and osteogenic differentiation, both stunted by HDL₃ exposure. SR-BI is likely a repressive regulator of osteogenesis as its expression is reduced in WT MSC following osteogenic treatment. The enhanced bone mass observed in *Scarb1*-null mice is likely the combined effect of the previously reported high ACTH levels (Martineau *et al*, 2014a) and intrinsic cellular alterations of the canonical and noncanonical Wnt pathways, and poorly related to plasma HDL levels in *Scarb1*-deficient mice. Future studies will focus on the potential crosstalk between SR-BI and both canonical and noncanonical Wnt pathways.

4.8 Acknowledgements

Grants. This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (RM: CIHR). CM is recipient of scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada.

Disclosures. No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors

Author contributions. L.B. and R.M. are responsible for conception and design of the research; C.M., O.K. and R.M. performed experiments; C.M. and O.K. analyzed the data; C.M., O.K. and R.M. interpreted the results of the experiments; C.M. and R.M. prepared the figures; C.M. drafted the manuscript; C.M., O.K., L.B. and R.M. edited and revised the manuscript; C.M., O.K., L.B. and R.M. approved the final version of the manuscript.

Table 4.1. Sequences of primers for gene expression

Symbol	Primers	Access #
<i>B2m</i>	F: 5'-TACTCACGCCACCCACCGGAG-3' R: 5'-GCTCGGCCATACTGGCATGCT-3'	NM_009735.3
<i>Lrp1</i>	F: 5'-CTCCCACCGCTATGTGATCC-3' R: 5'-CACAGCTGTTGGTGTCGTTG-3'	NM_008512.2
<i>Lrp5</i>	F: 5'-AAGGTTGTCGGAACCAACCC-3' R: 5'-CCTCGGGGATTATGCAGGTC-3'	NM_008513.3
<i>Lrp8</i>	F: 5'-ACGTGCTCCAGTGAAGAGTG-3' R: 5'-ACACTGAAATCTGCGGGGAC-3'	NM_001080926.1
<i>Axin2</i>	F: 5'-CCTGACCAAACAGACGACGA-3' R: 5'-CACCTCTGCTGCCACAAAAC-3'	NM_015732.4
<i>Lef1</i>	F: 5'-TTCAAGGACGAAGGCGATCC-3' R: 5'-CTCTGGCCTTGTCGTGGTAG -3'	NM_010703.4
<i>Scarb1</i>	F: 5'-CAGCCTGACAAGTCGCATGGCTC-3' R: 5'-AAAAGCACGCTGGCCCATGGTG-3'	NM_016741.2
<i>CcnD1</i>	F: 5'-CAAAATGCCAGAGGCGGATG-3' R: 5'-GAAAGTGCGTTGTGCGGTAG-3'	NM_007631.2
<i>CcnA2</i>	F: 5'-ACCTGCCTTCACTCATTGCT-3' R: 5'-AGGTCTGGTGAAGGTCCACA-3'	NM_009828.2
<i>Colla1</i>	F: 5'-ACTTCAGCTTCCTGCCTCAG-3' R: 5'-GCTTCTTTTCCTGGGGTTC-3'	NM_007742.3
<i>Sp7</i>	F: 5'-TTCGCATCTGAAAGCCCACT-3' R: 5'-TGCGCTGATGTTTGCTCAAG-3'	NM_130458.3
<i>Sost</i>	F: 5'-CAGGAATGATGCCACAGAGGT-3' R: 5'-GTCTGTCAGGAAGCGGGTG-3'	NM_024449.6
<i>Runx2</i>	F: 5'-CTCAGTGATTTAGGGCGCATTC-3' R: 5'-TTAATAGCGTGCTGCCATTTCG-3'	NM_001146038.2
<i>Ocn</i>	F: 5'-CAAGTCCCACACAGCAGCTT-3' R: 5'-AAAGCCGAGCTGCCAGAGTT-3'	NM_007541.3
<i>Dkk1</i>	F: 5'-CGGTTCTTGCCCGTGTTTAC-3' R: 5'-GAGCAGTACTCGTCAGAGCC-3'	NM_010051.3
<i>Wnt5a</i>	F: 5'-GTGATGCAAATAGGCAGCCG-3' R: 5'-AGCGTGGAATTCGTTCCCTTT-3'	NM_009524.3
<i>Wnt3a</i>	F: 5'-CCTCCGCTGGAGTAGCTTTC-3' R: 5'-GTTGTGACGGTTCATGGCAG-3'	NM_009522.2
<i>Rspo2</i>	F: 5'-AGCGAATGGGGAACGTGTAG-3' R: 5'-CTTGCATCTCCTGGACTCCG-3'	NM_172815.3
<i>Dmpl</i>	F: 5'-AGCTCAGAAAGCCAGTCCAC-3' R: 5'-TGGATCGGCTACTGTCCTGA-3'	NM_016779.2

4.9 Legend to the figures

Figure 4.1. Lack of SR-BI involvement in HDL association/binding and OxLDL-induced cytotoxicity in mouse MSC.

(A) Association of ^3H -E₂-HDL₃ (E₂ association), ^3H -CO-HDL₃ (CO association) and ^{125}I -HDL₃ (HDL₃ association), as well as ^{125}I -HDL₃ binding (HDL₃ binding) in WT and *Scarb1*-null MSC measured following the procedures described in the Material and Methods. Data are average \pm SEM of 3 to 6 independent cell preparations. (B) Metabolic activity measured by MTT assays in WT and *Scarb1*-null MSC exposed to 0-200 $\mu\text{g/mL}$ of OxLDL for 48 h. Data are average \pm SEM of 4 independent cell preparations. Bonferroni post-hoc test with significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) versus 0 $\mu\text{g/mL}$. (C) *Scarb1* genic expression in primary MSC following osteogenic treatment for 21 days. Data are average \pm SEM of 3 independent cell preparations. One-way ANOVA with significant difference ($P < 0.05$).

Figure 4.2. Effect of HDL on MSC of WT and *Scarb1*-null mice.

(A) *Scarb1* genic expression in WT MSC following 24h exposure to HDL₃ (150 $\mu\text{g/mL}$). Data are average \pm SEM of 4 independent cell preparations. Student t test with significant differences ($p < 0.01$) vs CTL. (B) Metabolic activity measured by MTT assays in WT and *Scarb1*-null MSC cultured for 6 days in control medium (2 % lipoprotein deficient serum-LPDS) with or without 150 $\mu\text{g/mL}$ LDL or HDL₃, *versus* complete medium condition (10 % FBS). Data are average \pm SEM of 6 independent cell preparations. Bonferroni post-hoc test with significant differences ($P < 0.05$) vs LPDS condition. (C) Gene expression of *CcnD1* and *CcnA2* in WT and *Scarb1*-null MSC following 24 h exposure to 150 $\mu\text{g/mL}$ of HDL₃ or culture medium (CTL). Data are average \pm SEM of 6 independent cell preparations. Bonferroni post-hoc test with significant differences vs WT ($\epsilon P < 0.05$) or vs CTL (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Figure 4.3. Expression of osteocytic genes in WT and null cells.

(A) Gene expression of *Runx2* in WT and *Scarb1*-null MSC under basal culture conditions. Data are average \pm SEM of 5 independent cell preparations. Student *t* test with significant differences vs WT (*** $p < 0.001$). Gene expression of *Sp7* and *Col1a1* (B) as well as of *Sost* and *Dmp1* (C) in WT and *Scarb1*-null MSC under basal conditions or following stimulation for 24 h with HDL (150 μ g/mL, B and C). Data are average \pm SEM of 3-6 independent cell preparations. Bonferroni post-hoc test with significant differences vs WT ($\epsilon p < 0.05$) or vs CTL (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (D) DAPI staining showing number of osteocytes, e.g. cells embedded within bone matrix, and (E) osteocyte density measured in WT and *Scarb1*-null vertebrae. Data are from 11 mice per group. Student *t* test with significant differences (* $p < 0.05$) vs WT. (F) Gene expression of *Ocn* in WT and *Scarb1*-null MSC under basal culture condition. Data are average \pm SEM of 3 independent cell preparations. Student *t* test with significant differences vs WT (* $p < 0.05$).

Figure 4.4. Expression of Wnt signaling molecules in WT and *Scarb1*-null MSC.

Representative agarose gel electrophoresis of PCR products (left panel) and real-time PCR analysis (right panel) for *Lrp1*, *Lrp5* and *Lrp8* receptors (A), for Wnt pathway intermediates *Axin2* and *Lef1* (B) and Wnt pathway ligands *Wnt5a*, *Dkk1*, *Wnt3a* and *Rspo2* (C). Data are from 4-6 independent cell preparations. Bonferroni post hoc test with significant differences (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) vs WT.

Figure 4.1 Lack of SR-BI involvement in HDL association/binding and OxLDL-induced cytotoxicity in mouse MSC.

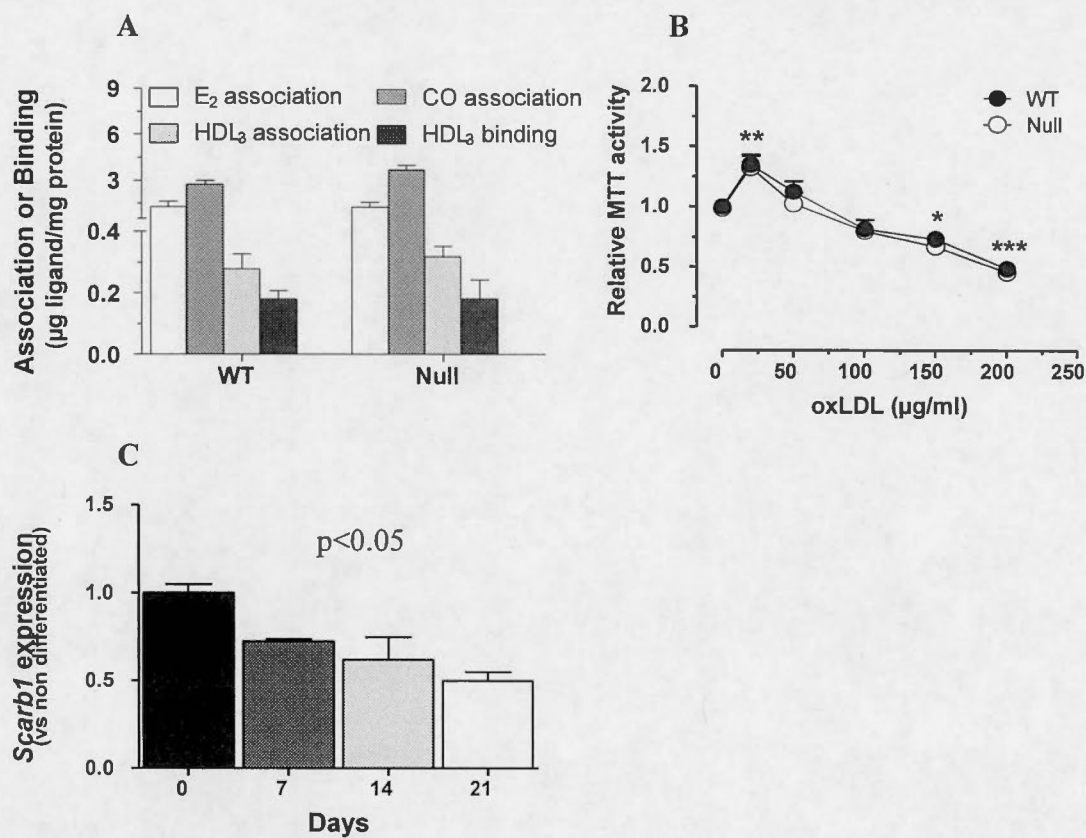


Figure 4.2 **Effect of HDL on MSC of WT and *Scarb1*-null mice.**

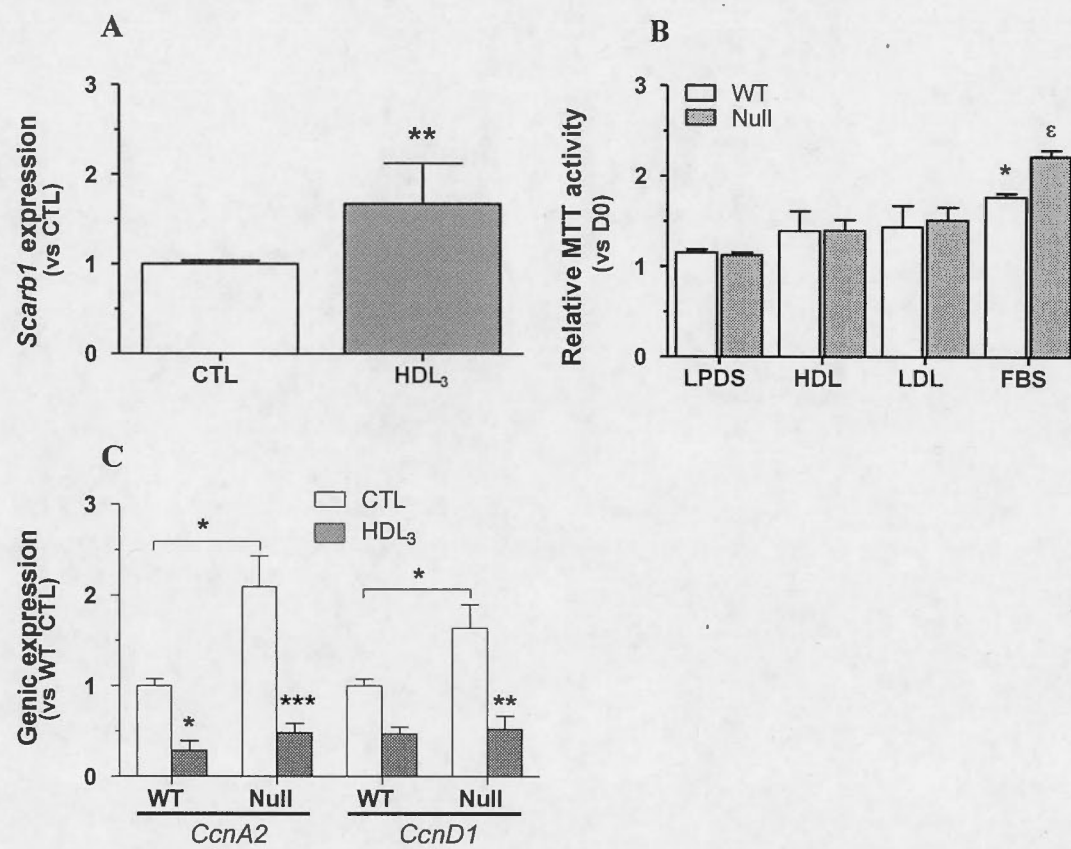


Figure 4.3 Expression of osteocytic genes in WT and null cells.

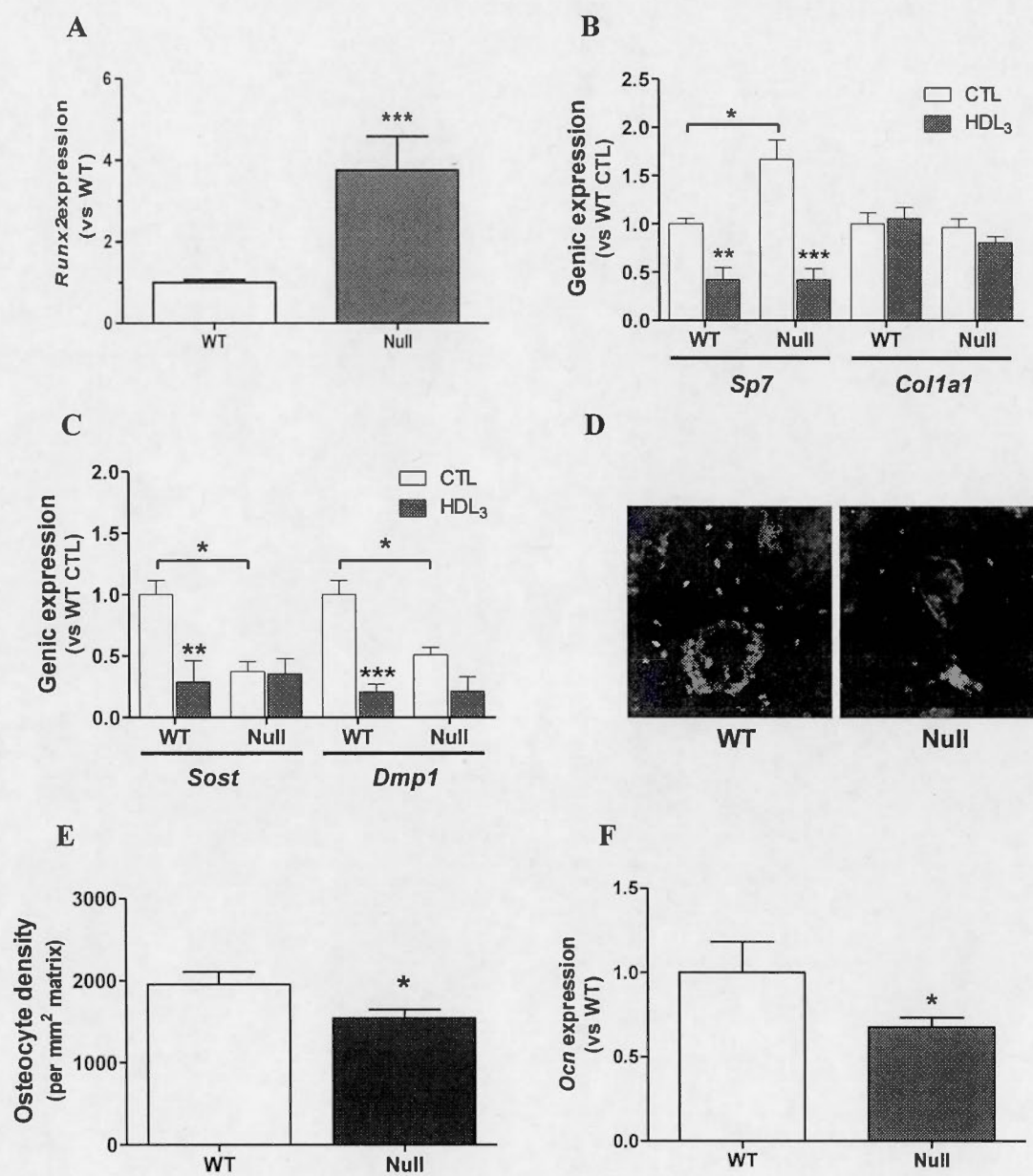
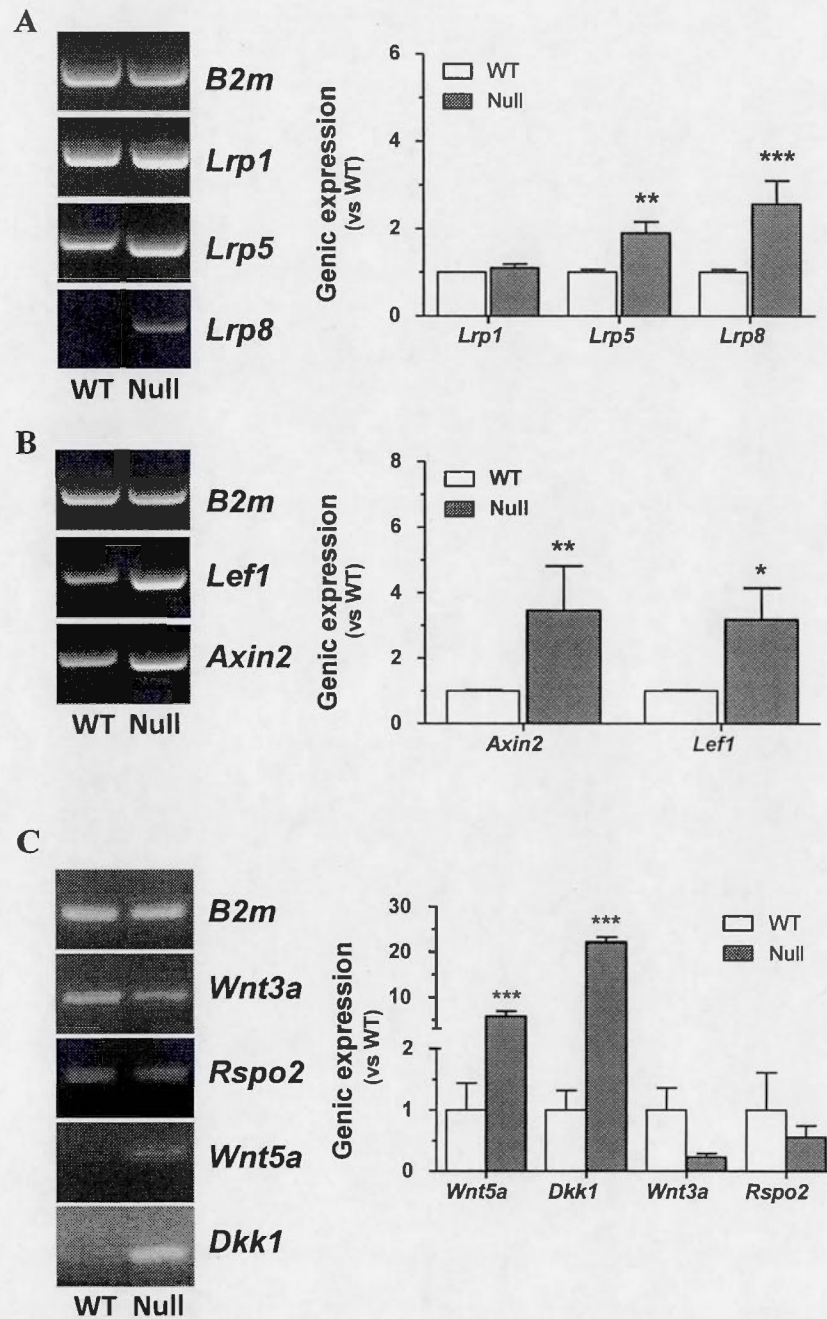


Figure 4.4 Expression of Wnt signaling pathways in WT and *Scarb1*-null MSC.



CHAPITRE V

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1 Récapitulation des altérations du métabolisme osseux chez les souris déficientes pour le récepteur SR-BI

Le SR-BI est classiquement considéré comme un récepteur de HDL (Acton *et al*, 1996) et les fonctions qui lui sont attribuées sont généralement associées au foie et au RCT (van der Velde et Groen, 2005; Zhang *et al*, 2005a), à la santé cardiovasculaire et aux macrophages (Bloodsworth *et al*, 2000; Ohashi *et al*, 2005), ainsi qu'aux tissus endocriniens produisant des hormones stéroïdiennes (Hoekstra *et al*, 2008; 2013). Les chapitres précédents ont mis en lumière de nouveaux rôles pour le SR-BI dans la régulation du métabolisme osseux. La déficience du gène *Scarb1* chez la souris provoque une hausse de la masse squelettique liée à une accentuation de la formation osseuse au niveau des trabécules fémorales, tant chez les mâles que les femelles. Ce phénotype osseux s'accompagne de modifications des niveaux plasmatiques de certains facteurs. Notamment, l'absence du SR-BI chez les deux genres empêche la libération de GC des surrénales face au stress; l'organisme y réagit en maintenant de hauts niveaux d'ACTH dans la circulation (voir chap. II et III; Hoekstra *et al*, 2008; 2010). Ensuite, la leptinémie est constitutivement élevée seulement chez les femelles déficientes pour *Scarb1*; parallèlement, seules les femelles présentent une masse osseuse vertébrale augmentée ainsi qu'un volume cortical accru, du moins à l'âge de 2 mois. Finalement, la déficience du gène *Scarb1* chez la souris se traduit par l'altération des fonctions des MSC. Entre autres, les MSC démontrent une hausse des potentiels prolifératif et de différenciation ostéogénique en absence du SR-BI, qui semblent liées à la baisse d'expression de *Cav1* dans les OB déficients pour *Scarb1*. Quoique dans les OB le SR-BI ne semble pas essentiel à la liaison des HDL₃ ou de leurs ligands associés, ni à la réponse des OB aux HDL₃, son absence se traduit par une dérégulation de l'expression de divers intermédiaires des voies de signalisation Wnt canonique et noncanonique.

5.1.1 Altérations du tissu osseux chez les souris déficientes pour *Scarb1*

Les chapitres II et III démontrent une augmentation de la masse osseuse indépendamment du genre chez les souris déficientes pour *Scarb1* au niveau des trabécules dans les épiphyses distales fémorales. Les différences les plus marquées sont observées à 2 mois; chez la souris, cette période représente l'atteinte de la maturité sexuelle et l'arrêt de la croissance longitudinale du squelette (Mohan *et al*, 2003). Une hausse de l'activité des chondrocytes au niveau des plaques de croissance auraient été mise en évidence par une longueur accrue des os longs (Mohan *et al*, 2003). Ceci n'a pas été observé dans les souris déficientes pour *Scarb1*, suggérant que la croissance osseuse n'est pas affectée et que l'absence de SR-BI n'influence pas l'activité des chondrocytes; son expression dans ces cellules n'est pas documentée. Nous observons d'ailleurs un rétablissement de la masse osseuse avec l'âge, qui malgré une tendance à la hausse, n'est plus significativement différente des valeurs des souris contrôles (voir appendice A). Il est possible que le défaut métabolique osseux des souris déficientes pour *Scarb1* se situe spécifiquement au moment où le modelage osseux cède la place au remodelage. Chez l'humain, c'est à l'adolescence que la plus grande proportion du pic de masse osseuse est atteint et représente le point critique où le modelage cède progressivement la place au remodelage (Perez-Lopez *et al*, 2010). Chez les filles, ce processus survient plus tôt dans le développement, généralement entre 11-14 ans, et 99 % de la masse osseuse est atteinte à l'âge de 26 ans; les garçons présentent un délai de 2-3 ans par rapport aux filles (Perez-Lopez *et al*, 2010). Il est possible que la déficience pour *Scarb1* altère la chronobiologie de ces événements, modifiant donc le moment et la vitesse à laquelle le pic de masse osseuse est atteint. Étant donné le dimorphisme sexuel pré-existant à ce niveau, il est logique que les deux genres soient affectés différemment.

Chez les souris mâles, la région corticale du fémur ainsi que les vertèbres lombaires n'affichent aucune altération pour les individus déficients pour *Scarb1*. Par contre, les femelles présentent un volume cortical augmenté ainsi qu'une masse supérieure au

niveau des vertèbres (chap. III). Puisque l'accumulation de masse osseuse n'est pas uniforme dans le temps ni l'espace et privilégie certains sites tels que les vertèbres lombaires et les épiphyses fémorales (Bonjour *et al*, 2009; Rizzoli *et al*, 2001), il est possible que les mâles et les femelles présentent des phénotypes osseux distincts au même âge. D'ailleurs, ces différences sont normalisées avec l'âge; malgré une tendance observable au niveau du fémur, les différences deviennent non-significatives à partir de 8 mois. Quoique les vertèbres n'aient pas été systématiquement analysées de 2 à 12 mois, nous supposons qu'elles suivent un profil similaire à celui observé dans les fémurs. Le fait que le cortex et les trabécules soient affectés chez les femelles indiquent que les modes d'ossification endochondrale et intramembranaire peuvent être altérés par la déficience pour *Scarb1*; effectivement, ces deux modes d'ossification débutent par la condensation des MSC (Day et Yang, 2008) et le *Scarb1* est plus fortement exprimé dans ces cellules, modulant potentiellement les étapes précoces de ces deux processus. De plus, certaines perturbations endocriniennes ont été relevées chez ces souris; certaines sont présentes dans les deux genres, d'autres sont spécifiques aux femelles et peuvent expliquer en partie les altérations squelettiques liées au genre. Ces différents axes endocriniens sont discutés plus avant dans les sections suivantes.

5.1.2 Perturbation de l'axe glucocorticoïdes/adrénocorticotrophine chez les souris déficientes pour *Scarb1*.

L'importance du SR-BI au niveau de la synthèse de GC des glandes surrénales est bien documentée (Hoekstra *et al*, 2008; 2010; 2013; Rigotti *et al*, 2003). Chez les souris mâles déficientes pour *Scarb1*, l'incapacité de générer des pics de GC suivant un stress est accompagnée de niveaux constitutivement élevés d'ACTH (Hoekstra *et al*, 2008; 2013). Étant donné les effets anaboliques de l'ACTH sur l'os observés *in vitro* (Isales *et al*, 2010), un effet attendu de niveaux élevés d'ACTH tels qu'observés chez les souris déficientes pour *Scarb1* serait une hausse de la masse osseuse. Le déséquilibre de l'axe GC/ACTH est également présent chez la femelle déficiente

pour *Scarb1*; les hauts taux circulants d'ACTH cadrent bien avec la masse osseuse augmentée observée chez ces souris. Quoique l'effet principal de l'ACTH soit de stimuler la production de GC par les glandes surrénales, d'autres effets sont rapportés dont la hausse de la pression artérielle (Lorenz *et al*, 2008) ainsi que des effets néphroprotecteurs (Si *et al*, 2013). Quoiqu'il ne soit pas connu si les souris déficientes pour *Scarb1* affichent une pression artérielle augmentée, il n'y a pas de corrélation entre l'hypertension et l'expression de *Scarb1* chez l'être humain (Xu *et al*, 2009). De plus, cet effet de l'ACTH dépend largement de la synthèse stéroïdienne des GC qui modulent directement la tension artérielle (Lorenz *et al*, 2008). Quant aux effets néphroprotecteurs, ils surviennent par un mécanisme indépendant des stéroïdes, notamment à travers le récepteur MC1R (Si *et al*, 2013). Puisque dans le cadre de notre étude, les souris déficientes pour *Scarb1* n'ont pas été soumises à une insulte néphrotoxique, il n'est pas connu si cet effet a un impact dans ce modèle. Il est à noter que le MC1R est exprimé dans les OB (Zhong *et al*, 2005); il est donc concevable que l'ACTH agisse directement sur les OB par ce récepteur.

Outre les travaux de Isales (2010) et de Zaidi (2010), les effets ostéoanaboliques de l'ACTH sont peu documentés; celle-ci semble toutefois induire la production de collagène par les OB *in vitro* ainsi que protéger contre l'ostéonécrose induite par les GC *in vivo*. Puisque les OB déficients pour *Scarb1* semblent répondre normalement à l'ACTH en termes de prolifération et d'expression du *Colla1*, les souris déficientes pour *Scarb1* représentent un modèle intéressant à cet effet étant donné leurs niveaux constitutivement élevés d'ACTH. Notamment, les résultats des chapitres II et III montrent que l'ACTH stimule la prolifération des MSC, en plus de stimuler l'expression des gènes ostéoblastiques *Sp7* et *Colla1*, ce qui est en accord avec son effet ostéoanabolique. Ainsi, la masse osseuse accrue chez les souris déficientes pour *Scarb1* serait en accord avec l'effet anabolique de l'ACTH. Cependant, la proportion du phénotype attribuable à la hausse d'ACTH *versus* celle associée à la baisse de GC demeure indéterminée; effectivement, les GC sont reconnus pour inhiber la formation

et activer la résorption osseuses (Rauch *et al*, 2010). De plus, puisque ces altérations sont présentes chez les deux sexes, elles ne peuvent expliquer les différences phénotypiques entre les mâles et les femelles. Ces dernières prennent vraisemblablement source dans d'autres axes hormonaux, détaillés plus bas.

5.1.3 Impacts genre-spécifiques de l'ablation de *Scarb1* et débalancement de la leptinémie chez les femelles déficientes pour *Scarb1*

Nous avons observé des taux de leptine circulante constitutivement élevés chez les femelles déficientes pour *Scarb1* seulement (voir chap. III); un lien entre l'expression de *Scarb1* et la leptinémie n'a jamais été rapporté dans la littérature. Puisque la leptine est également reconnue pour augmenter la masse osseuse dans des modèles murins (Turner *et al*, 2013), les hauts taux de leptine observés chez les femelles pourraient donc contribuer aux différences observées entre les deux genres, notamment la masse osseuse augmentée au niveau des vertèbres ainsi que du cortex fémoral, qui ne montrent aucune altération chez les mâles (voir chap. II et III). En accord avec les niveaux accrus de leptine circulante chez les souris mutantes femelles, nos résultats indiquent une expression génique augmentée de la leptine par le tissu adipeux de ces souris. De plus, les résultats présentés au chapitre III indiquent que la leptine stimule l'expression des gènes ostéoblastiques *Sp7* et *Colla1*, indiquant un effet ostéanabolique en accord avec le phénotype osseux spécifique aux souris femelles déficientes pour *Scarb1*.

Par ailleurs, nos travaux indiquent que les niveaux plasmatiques d'E₂ sont normaux chez ces femelles, suggérant qu'un débalancement des niveaux circulants d'E₂ n'est pas la source du phénotype osseux spécifique aux femelles déficientes pour *Scarb1*. Les raisons pour lesquelles seulement les femelles présentent ces anomalies en absence du SR-BI demeurent spéculatives. Bien que les niveaux d'E₂ total en circulation soient normaux, ceci n'exclut pas un débalancement hormonal au sein des tissus ou de la réponse cellulaire qui pourrait contribuer à cette différence au niveau

des vertèbres et de la leptinémie. En effet, certaines études rapportent des liens entre les œstrogènes et la leptinémie. Notamment, les œstrogènes coopèrent au niveau du système nerveux central avec l'axe hormonal de la leptine dans la régulation des métabolismes reproductif et énergétique (Gao et Horvath, 2008). L'E₂ module la signalisation de la leptine en interférant avec la phosphorylation du facteur STAT3 selon un mécanisme encore indéterminé (Gao et Horvath, 2008). Il est donc possible que les niveaux d'E₂ naturellement plus élevés chez les femelles puisse moduler la sécrétion de leptine de manière spécifique au genre. Il serait donc pertinent de vérifier l'état de phosphorylation du STAT3 dans les tissus issus de mâles *versus* ceux issus de femelles. De plus, des différences existent entre les genres au sujet de ces deux facteurs : le tissu adipeux sécrète davantage de leptine en réponse à l'E₂ chez les femmes, mais pas chez les hommes (Casabiell *et al*, 1998). Il est inconnu si le SR-BI participe à cette réponse. Toutefois, considérant les travaux de Casabiell *et al* (1998), l'hyperleptinémie chez les souris femelles déficientes pour *Scarb1* pourrait être associée à une hausse du niveau d'E₂ au sein de certains tissus sans que le niveau de la fraction totale circulante ne soit modifiée.

D'intérêt, il existe des sites extragonadiques de biosynthèse d'E₂ dont les tissus osseux et adipeux (Simpson *et al*, 1999; Simpson, 2003). Contrairement aux gonades, les tissus adipeux et osseux ne synthétisent pas les précurseurs de l'E₂ et dépendent de leur disponibilité dans la circulation (Simpson *et al*, 1999). Ces précurseurs sont largement associés aux lipoprotéines et stockés dans les tissus adipeux sous forme estérifiée (Vihma et Tikkanen, 2011). Le tissu adipeux exprime fortement le SR-BI (Tondou *et al*, 2005) et est naturellement plus abondant chez les femelles (Blaak *et al*, 2001). Ce tissu étant la principale source de leptine (Guerre-Milo, 2004), il est possible que l'absence du SR-BI perturbe le métabolisme des adipocytes et que ses effets soient plus marqués chez la femelle. Les résultats du chapitre II montrent que le SR-BI n'est pas essentiel à la captation sélective des esters d'E₂ par les OB et son impact à ce niveau dans les adipocytes est inconnu; nous supposons que la captation

des précurseurs de l'E₂ est également inchangé. D'intérêt, la leptine induit l'expression et l'activité de l'aromatase, l'enzyme convertissant ces précurseurs en E₂, dans les adipocytes (Liu *et al*, 2013c); il est donc possible que la concentration tissulaire locale de l'E₂ soit augmentée dans ce contexte. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en observant l'expression et l'activité de l'aromatase dans les tissus déficients pour *Scarb1*.

Bien que les taux de leptine circulante soient constitutivement élevés chez les femelles déficientes pour *Scarb1*, leurs niveaux circulants d'adiponectine sont normaux (voir appendice B); son expression dans les adipocytes n'a toutefois pas été vérifiée. Récemment, une étude de Won *et al*, (2013) a relevé des profils métabolomiques distincts entre les souris *ob/ob* mâles et femelles; notamment, les mâles affichent des dérèglements au niveau de la signalisation de l'insuline tandis que chez les femelles, ces perturbations sont associées au métabolisme des lipides (Won *et al*, 2013). D'intérêt particulier dans cette étude, les souris femelles *ob/ob* affichent une hausse des métabolites associés à la synthèse d'acides biliaires par rapport aux souris femelles contrôles (Won *et al*, 2013), une voie dans laquelle le SR-BI est reconnu pour participer par ses fonctions dans le RCT (Malerod *et al*, 2005). L'insuline est reconnue pour induire la sécrétion de la leptine par les adipocytes (Cammisotto et Buckwiecki, 2002; Yvan-Charvet *et al*, 2007). Il serait intéressant d'étudier si cet axe hormonal est affecté différenciellement entre les souris mâles et femelles déficientes pour *Scarb1*, puisque le SR-BI semble nécessaire à la réponse normale des adipocytes à l'insuline (Yvan-Charvet *et al*, 2007). Notamment, la sécrétion de la leptine par les adipocytes repose partiellement sur un mécanisme AMPc-dépendant (Yvan-Charvet *et al*, 2007); considérant la diminution de la cavéoline-1 dans les cellules déficientes pour *Scarb1* et l'inhibition du système PKC-AMPc au sein des cavéoles (Smart *et al*, 1999), cette voie pourrait être suractivée dans les adipocytes déficients pour *Scarb1* (voir section 5.1.4.2).

Un autre facteur qui n'a pas été vérifié est la proportion d'E₂ associée aux lipoprotéines. Effectivement, près de 50 % de l'E₂ circulant est véhiculé sous forme estérifiée par les HDL (Abplanap *et al*, 2000). Puisque chez les souris déficientes pour *Scarb1*, les particules de HDL sont anormalement gorgées en cholestérol (Rigotti *et al*, 1997), il est possible qu'une plus grande proportion d'esters d'E₂ soit séquestrée dans ces lipoprotéines ce qui aurait pour effet de réduire la quantité d'E₂ libre disponible dans le plasma pour moduler le comportement cellulaire. Une séquestration de l'E₂ circulant dans les HDL aurait un impact systémique généralisé. De plus; puisque l'E₂ disponible pour lier le ER serait en quantité réduite, les réponses cellulaires génotropiques et non génotropiques seraient altérées. Il serait possible de doser directement la quantité d'E₂ dans les différentes fractions de lipoprotéines *versus* le plasma total par ELISA, ce qui donnerait une appréciation générale de la proportion de cette hormone dans les lipoprotéines par rapport à la quantité plasmatique totale. De plus, cette interprétation pourrait expliquer pourquoi seules les femelles sont affectées, puisque la testostérone, soit l'androgène dominant chez le mâle, n'est pas véhiculé par les lipoprotéines.

Les différences spécifiques au genre résultent vraisemblablement de l'environnement physiologique propre à chaque sexe. Il serait possible de récapituler ces conditions spécifiques aux mâles et aux femelles et de les tester *in vitro* sur des cellules ostéoblastiques. Puisque l'E₂ est le paramètre pouvant expliquer les différences du phénotype osseux entre mâles et femelles déficients pour *Scarb1*, des cultures primaires d'OB issues de souris contrôles et déficientes pour *Scarb1* de chaque genre pourraient être analysées suite à une exposition à différentes concentrations d'E₂, reflétant les différents taux circulants chez les mâles et chez les femelles, et d'observer si les concentrations retrouvées chez les femelles sont suffisantes pour induire des réponses différentes, et si la réponse cellulaire est altérée. Pour mesurer la réponse génotropique des cellules déficientes pour *Scarb1* à l'E₂, celles-ci pourraient être transfectées avec un vecteur contenant le gène reporteur de la luciférase (*Luc*) au

niveau de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) afin d'observer la fluorescence émise par les cellules exposées à l'E₂ ou autre agoniste (Khanal *et al*, 2014).

5.1.4 Altérations des fonctions ostéoblastiques des cellules déficientes pour *Scarb1*

Des dysfonctions au niveau des cellules stromales donnant naissance aux OB ont également été relevées chez les souris déficientes pour *Scarb1*; celles-ci sont en accord avec leur formation et leur masse osseuses accrues. Qu'elles soient issues de souris mâles ou femelles, les MSC déficientes pour *Scarb1* présentent une prolifération et un potentiel de différenciation accentués, qui semblent associés à la baisse d'expression de la *Cav1* (voir chap. II). Effectivement, la cavéoline-1 est reconnue pour moduler de nombreuses fonctions cellulaires et sa perte d'expression rehausse la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques (Baker *et al*, 2012). Ce plus grand potentiel prolifératif dans les cellules déficientes pour *Scarb1* est appuyé par la surexpression des *CcnD1* et *A2* ainsi que de plusieurs joueurs dans les voies canonique et noncanoniques des Wnt (voir chap. IV). Le potentiel de différenciation accentué de ces cellules est également corroboré par une surexpression de *Sp7*, soit un facteur de transcription OB-spécifique (Komori, 2006), ainsi que par une surexpression de certains intermédiaires des voies Wnt (voir chap. II, III et IV), qui régulent à la fois prolifération et différenciation (Boudin *et al*, 2013). L'importance des voies Wnt dans le tissu osseux se manifeste effectivement au niveau de la prolifération des précurseurs ostéoblastique *via* l'induction des cyclines par *Tcf/Lef1* (Westendorf *et al*, 2004) ainsi qu'au niveau de leur différenciation ostéoblastique en modulant l'expression de marqueurs ostéogéniques (Boudin *et al*, 2013). Une façon d'exploiter le modèle murin déficient pour *Scarb1* serait d'abolir l'expression du *Scarb1* spécifiquement au niveau des OB à l'aide d'un système *cre-lox* selon la stratégie abordée à la section 5.1.5.

Le mécanisme précis selon lequel le SR-BI module l'expression de l'ensemble de ces gènes demeure inconnu. Dans le cas de *Cav1*, une étude rapporte que son expression

est modulée par l'homéostasie cellulaire du cholestérol (Frank *et al*, 2006). De plus, des éléments de réponse au sein du promoteur du gène *Cav1* agissent comme répresseur de concert avec le SREBP1 (*sterol regulatory-binding protein 1*) (Bist *et al*, 1997). Ainsi, une modulation de l'expression de *Cav1* par le SREBP1 est envisageable puisque l'activité transcriptionnelle de ce dernier est activée en réponse à une baisse de cholestérol cellulaire; cependant, ce même processus induit l'expression de *Scarb1* (Kathuria *et al*, 2004; Rigotti *et al*, 2003). Bien qu'une répression de l'expression de *Cav1* par une augmentation de l'activité de SREBP1 dans les MSC des souris déficientes pour *Scarb1* soit plausible, ce mécanisme devrait provenir d'une diminution du cholestérol cellulaire. Une telle diminution devrait être vérifiée, mais la mesure de la captation sélective de CE des HDL n'a pas mis en évidence de différences entre les MSC provenant de souris contrôles ou déficientes pour *Scarb1* (voir chap. IV). Une baisse du cholestérol cellulaire pourrait provenir d'une réduction de la captation globale des LDL par la voie du LDLR, d'une hausse de l'efflux du cholestérol selon un mécanisme indépendant de SR-BI ou d'une réduction de la synthèse *de novo* du cholestérol. Bien que la baisse d'expression de *Cav1* suggère des altérations potentielles de l'homéostasie cellulaire du cholestérol dans les cellules déficientes pour *Scarb1*, il est pour l'instant impossible de conclure quant à l'implication de SREBP1. Des analyses de l'activité transcriptionnelle de ce facteur permettraient de trancher la question. D'autres facteurs régulent l'expression de *Cav1* et de *Scarb1*, notamment le PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) qui peut induire l'expression des deux gènes parallèlement (Chinetti *et al*, 2000; Hu *et al*, 2010). En considérant la faible expression de *Cav1* dans les cellules déficientes pour *Scarb1*, nous pourrions prévoir une plus faible activité du PPAR γ . Cette hypothèse est attrayante puisque la voie PPAR γ occupe des fonctions complémentaires à la voie Wnt/ β -caténine dans la balance entre la différenciation ostéogénique et adipogénique des MSC (Takada *et al*, 2009).

Effectivement, lors de la différenciation des MSC en OB, le PPAR γ et ses gènes-cibles sont réprimés au profit de l'expression de gènes OB-spécifiques tels que le BMP-2 et divers ligands de la voie Wnt (Takada *et al*, 2009); ceci concorde bien avec la baisse d'expression de *Scarb1* observée dans les OB différenciés (voir chapitre IV). D'intérêt dans cette hypothèse, la surexpression ciblée du PPAR γ dans les OB inhibe le gain de masse osseuse chez les souris mâles et accélère la perte de masse osseuse chez les souris femelles ovariectomisées (Cho *et al*, 2011). Cette voie présente donc également des variations en fonction du genre, ce qui pourrait expliquer le phénotype osseux accentué observée chez les femelles déficientes pour *Scarb1* (voir chapitres II et III). Étant donné qu'une interaction directe est inconnue entre les gènes des intermédiaires des voies Wnt et le facteur de transcription PPAR γ , nous avançons que le débalancement de l'expression des intermédiaires de la voie Wnt serait lié à une altération du PPAR γ , étant le reflet d'une perturbation des cavéoles et/ou de l'homéostasie cellulaire du cholestérol. Conséquemment, puisque les voies Wnt canoniques et non-canoniques influencent la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques (Boudin *et al*, 2013), ceci expliquerait également la hausse d'expression des cyclines et la modulation de l'expression des marqueurs ostéoblastiques/ostéocytaires dans les cellules déficientes pour *Scarb1*. Ces hypothèses sont détaillées plus avant dans les sections 5.1.4.1 et 5.1.4.2.

5.1.4.1 Perturbation des signalosomes associés à la cavéoline-1

Les cavéoles sont des structures permettant le recrutement de divers récepteurs et molécules signalétiques, désignées « signalosomes » (Smart *et al*, 1999). Une absence de cavéoline-1 déstabilise ces signalosomes et peut générer deux effets distincts sur une voie signalétique : soit l'inhiber partiellement ou complètement, tel que rapporté pour le α ER qui doit interagir avec la cavéoline-1 pour une activation optimale (Schlegel *et al*, 1999), soit au contraire l'activer de façon constitutive ou incontrôlée, par exemple dans le cas de la PKA ou de la PKC qui sont normalement inhibées par

la liaison à la cavéoline-1 (Smart *et al*, 1999). D'ailleurs, une hausse de l'activité PKC est associée à la prolifération des OB humains induite par le PDGF (Lampasso *et al*, 2002), tandis que la PTH stimule la prolifération de la lignée ostéoblastique MC3T3-E1 selon un mécanisme dépendant de la PKA et de la cycline D1 (Datta *et al*, 2007). Ces mécanismes pourraient être sollicités dans la prolifération accrue des cellules déficientes pour *Scarb1*. Effectivement, il a été rapporté que le SR-BI possède des domaines d'interaction pour la PKC et la PKA aux extrémités C- et N-terminales (pour une revue, voir Rhainds et Brissette, 2004). La relation précise entre le SR-BI et ces protéines est inconnue, mais puisque l'absence du SR-BI diminue l'expression de la cavéoline-1 et que celle-ci maintient ces intermédiaires signalétiques inactifs (Smart *et al*, 1999), il est possible que les cellules déficientes pour *Scarb1* présentent une suractivation des PKA et PKC. Une telle anomalie cadrerait avec la hausse observée de l'expression des cyclines puisqu'il a été rapporté que l'expression de *CcnD1* peut être induite par la PKC (Li et Weinstein, 2006) et celle de *CcnA2* par la PKA (Song *et al*, 2008). Une démonstration possible de cette relation dans les cellules déficientes pour *Scarb1* serait d'observer leur prolifération en présence d'inhibiteurs spécifiques à la PKC, par exemple la bryostatine 1 (Mochly-Rosen *et al*, 2012), ou à la PKA, tel que le monophosphothioate-R_p-adénosine-3',5'-cyclique (R_p-cAMPS) (Murray, 2008). En parallèle, une analyse du cycle cellulaire par cytomètre de flux suivant un marquage à l'iodure de propidium suite à ces traitements, combinée à un immunomarquage fluorescent des cyclines, permettrait de confirmer dans quelle phase du cycle cellulaire ces cellules se trouvent.

Il est possible que la perturbation de l'homéostasie du cholestérol induite par l'absence du SR-BI ait un grand rôle à jouer dans les dysfonctions des cellules déficientes pour *Scarb1*. Certains auteurs argumentent que ce récepteur sert de détecteur de cholestérol (Saddar *et al*, 2013). Cette étude démontre que la portion transmembranaire C-terminale du SR-BI est nécessaire à la détection du cholestérol membranaire sans toutefois affecter les fonctions de captation sélective ni d'efflux

(Saddar *et al*, 2013). Cependant, les auteurs ont mesuré une baisse de 71 % de la liaison des HDL₃, ce qui n'est pas le cas dans notre modèle (voir chap. IV); possiblement l'absence totale du SR-BI dans notre système permet une compensation par un autre récepteur dans cette fonction. De plus, la signalisation cellulaire normalement associée au SR-BI, par exemple les interactions avec les PKA, PKC et eNOS (Calvo et Vega, 1993; Mineo et Shaul, 2012; Witt *et al*, 2000), serait absente dans les cellules déficientes pour *Scarb1* mais théoriquement fonctionnelle dans le système utilisé par Saddar *et al*, (2013). Ceci pourrait altérer diverses fonctions cellulaires, particulièrement celles dépendantes des cavéoles. Les travaux de Frank *et al* (2002) affirment que la hausse du cholestérol cellulaire *via* le SR-BI induit une stabilisation de l'expression de la cavéoline-1 dans les cellules rénales HEK-293T. La perturbation des cavéoles pourrait être l'élément clef de ces dysfonctions. Par l'analyse de gradients de sucrose discontinus sur des cellules contrôle et déficientes pour *Scarb1*, il serait possible d'observer le degré d'expression de la protéine ainsi que la distribution de la cavéoline-1 dans les OB afin de confirmer le nombre réduit de cavéoles en absence de SR-BI. Des résultats préliminaires suggèrent que la cavéoline-1 est délocalisée suivant une stimulation à l'ACTH ou à la leptine (voir appendice C); une perturbation de son expression pourrait donc altérer ces réponses. Quoique les cellules mutantes répondent normalement à l'ACTH et à la leptine en terme de prolifération et d'expression génique du *Coll1a1* (voir chap. II et III), les résultats des chapitres III et IV montrent également que les altérations de l'expression génique basale de *Sp7*, *Sost* et *Dmpl* empêchent une réponse normale à ces hormones. Peut-être les cavéoles sont-elles désorganisées en absence du SR-BI, altérant donc les réponses cellulaires dépendantes de ces structures membranaires.

Tel que mentionné précédemment, aucune différence n'a été relevée entre les niveaux d'E₂ des souris contrôles ou déficientes pour *Scarb1*. Cependant, des niveaux plasmatiques normaux d'E₂ ne signifient pas nécessairement une réponse normale des cellules y étant exposées. Il existe une forme membranaire du ER associée aux

cavéoles (Aguirre *et al*, 2007; Kousteni *et al*, 2002; Krum, 2011; Moriarty *et al*, 2006). L'E₂ est connu comme un inhibiteur de l'apposition périostéale (Vanderschueren, 2004; 2006); étant donné la sous-expression de la cavéoline-1 dans les cellules déficientes pour *Scarb1*, il est possible que cette signalisation soit affectée. Une telle perturbation affecterait tous les tissus riches en cavéoles; les réponses cellulaires classiques de type génotropique, soit indépendantes des cavéoles, demeureraient in affectées. Le récepteur d'androgènes (AR) est également associé aux cavéoles (Lu *et al*, 2001); conséquemment une perturbation de la signalisation des androgènes pourrait aussi être en cause. Nous n'avons pas vérifié les taux d'androgènes circulants. Quoique ces derniers soient surtout associés au système masculin, ils ont un impact significatif sur le développement chez la femelle (Vanderschueren, 2004; 2006). Au niveau osseux, ils permettent l'apposition périostéale tant chez le mâle que chez la femelle; celle-ci est toutefois ralentie par l'effet inhibiteur de l'E₂ chez la femelle (Vanderschueren, 2004, 2006). Une perturbation au niveau des androgènes se serait toutefois manifestée chez les souris mâles également, ce qui n'est pas le cas dans la présente étude.

5.1.4.2 La perturbation des voies Wnt canonique et non-canonique

Les résultats du chapitre IV indiquent que les gènes des co-récepteurs *Lrp5* et *Lrp8*, ainsi que l'*Axin2* et *Lef1* sont surexprimés dans les MSC déficientes pour *Scarb1*, suggérant une activité accrue de la voie de signalisation canonique Wnt (Martineau *et al*, 2014c). De plus, la surexpression du *Dkk1* et du *Wnt5a*, des ligands inhibant la voie canonique et activant la voie non-canonique respectivement (Westendorf *et al*, 2004), pourrait être interprétée comme une réponse à la suractivation de la voie Wnt canonique. Le gène de *Dkk1* est induit suite à l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans un mécanisme de rétroinhibition (Niida *et al*, 2004). Quant au *Wnt5a*, il semble refléter une suractivation de la voie Wnt non-canonique. Dans le processus de formation synaptique, les voies canonique et non-canonique occupent des rôles

complémentaires (Davis *et al*, 2008). Conséquemment, il est possible que la surexpression du Wnt5a dans les OB déficients pour *Scarb1* soit un mécanisme régulateur de la voie canonique. Les travaux de Galbiati *et al*, (2000) et de Lu *et al*, (2003) illustrent que la cavéoline-1 inhibe la voie canonique Wnt/ β -caténine. Il est possible que la prolifération et la différenciation soient stimulées par cette voie dans les cellules déficientes pour *Scarb1*, en conséquence de la diminution de l'expression de la cavéoline-1. D'ailleurs, les mutations gain-de-fonction du gène *Lrp5*, suractivant la voie Wnt/ β -caténine, provoquent une hausse de la masse osseuse (Balemans *et al*, 2007), mais à un degré de loin supérieur au phénotype observé ici. Cette voie mériterait un approfondissement afin de confirmer s'il y a une forme de communication croisée entre la signalisation SR-BI/cavéoline-1 et les voies Wnt. Le cas échéant, une modulation de l'activité des voies Wnt pourrait être considérée en ciblant le SR-BI ou son gène *Scarb1*.

D'intérêt dans cet axe de recherche, le Wnt3a est véhiculé dans la circulation par les lipoprotéines (Neumann *et al*, 2009), ce qui pourrait être un facteur clef dans une communication croisée entre le SR-BI et la voie Wnt/ β -caténine. Quoique le Wnt3a puisse être véhiculé par les LDL et les HDL, le SR-BI est nécessaire au relargage du Wnt3a spécifiquement vers les HDL. En ce sens, il est possible que les fonctions d'efflux du SR-BI module la signalisation Wnt3a en contrôlant la quantité de ligand disponible en circulation. Également, l'absence de palmitoylation du Wnt3a en provoque le relargage non-spécifique selon des mécanismes indépendants des HDL (Neumann *et al*, 2009), ce qui suggère une localisation dans les fractions cavéolaires de la forme de sécrétion régulée par SR-BI, tel que rapporté pour de nombreuses protéines (Aicart-Ramos *et al*, 2011). Paradoxalement, l'inhibition temporaire de l'expression du SR-BI stimule la sécrétion du Wnt3a (Neumann *et al*, 2009); l'effet de ce traitement sur l'expression de la cavéoline-1 n'a pas été vérifié. Il demeure à voir si d'autres agonistes/antagonistes des voies Wnt s'associent aux lipoprotéines; la présence de ceux-ci pourraient être vérifiée par immunodétection de différentes

fractions de lipoprotéines. De plus, l'effet de l'ablation de *Scarb1* sur l'expression génique des Wnt semble ambiguë; les résultats du chapitre IV suggèrent une importante surexpression du Wnt5a, tandis que celle du Wnt3a tend vers la baisse. La relation entre l'expression génique des Wnt et leur sécrétion demeure à déterminer dans les MSC déficients pour *Scarb1*.

Les résultats du chapitre IV rapportent que les souris déficientes pour *Scarb1* présentent à la fois une suractivation des voies Wnt, une diminution de l'expression de *Sost* et *Dmp1*, ainsi qu'une densité réduite d'OS au niveau du tissu osseux (Martineau *et al*, 2014c). La suractivation de cette signalisation Wnt semble défavorable à la différenciation terminale en OS, tel que suggéré par la faible expression de *Sost/Dmp1* et le nombre réduit d'OS observé dans les vertèbres des souris déficientes pour *Scarb1*. Possiblement la baisse d'expression de la cavéoline-1 dans les MSC déficientes pour *Scarb1* lève une forme d'inhibition de la voie Wnt et engendre un déséquilibre des populations cellulaires dans le tissu osseux. Les OS sont essentiels au maintien de l'homéostasie squelettique; l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine spécifiquement dans ces cellules dans un modèle murin dont la déficience en β -caténine est sous le contrôle du promoteur du gène ostéocytaire *Dmp1* (système *cre-lox*) provoque un phénotype à faible masse osseuse lié à une très faible expression d'OPG par les OS (Kramer *et al*, 2010). Nous pourrions espérer un phénotype opposé dans le cas d'une hausse de cette signalisation tel qu'observé dans la présente étude; de plus, ceci pourrait avoir des répercussions sur la réponse adaptative des os face au stress mécanique. Les OS sont responsables de la transduction des stimuli mécaniques en signaux biochimiques (Komori 2006; 2013); la réduction de leur nombre, notamment en lien avec l'âge, est corrélée avec une moindre réponse au stress mécanique (Joiner *et al*, 2014). Les propriétés mécaniques des os des souris déficientes pour *Scarb1* n'ont pas été vérifiées. D'intérêt, les travaux de Gortazar *et al*, (2013) démontrent que la cavéoline-1 et la voie Wnt/ β -caténine sont impliquées dans les OS soumis à un stress mécanique. Il est donc concevable que le SR-BI, par

son effet stabilisateur sur l'expression de *Cav1*, puisse influencer la réponse des OS aux stimuli mécaniques.

5.1.5 Importance relative des effets systémiques et locaux du SR-BI sur la régulation du métabolisme osseux

La présente étude ne permet pas de discriminer entre les effets systémiques et cellulaires du SR-BI. Certains modèles expérimentaux peuvent être considérés afin d'établir une telle distinction : 1) des essais de transplantation de glandes surrénales de souris déficientes pour *Scarb1* chez des souris congéniques contrôles, tels que pratiqués par Hoekstra *et al* (2013), permettraient d'introduire spécifiquement l'altération des fonctions surrénales et ainsi détermineraient si l'absence de réponse en GC et la hausse concomitante en ACTH sont suffisantes pour générer une hausse de masse osseuse; 2) des essais de formation d'ossicules ectopiques, soit l'ensemencement de cellules contrôles sur des éponges de collagène implantées sous la peau de souris contrôles ou déficientes pour *Scarb1*, permettraient de savoir si les dysfonctions systémiques observées en absence de *Scarb1* permettent une formation osseuse accrue indépendamment des altérations cellulaires; 3) des modèles de délétion ou d'insertion tissu-spécifique du gène *Scarb1* à l'aide d'un modèle *cre-lox* qui, à partir d'une lignée murine contenant le gène *cre* de recombinaison sur un promoteur spécifique aux tissus ciblés, croisée à une lignée de souris dont le gène *Scarb1* est flanqué de sites *lox* permettant sa recombinaison tissu-spécifique, permettraient l'observation de sa fonction au niveau des glandes surrénales ou du tissu adipeux (Nagy, 2000). La perte de l'expression du *Scarb1* au niveau des glandes surrénales devrait augmenter les niveaux d'ACTH et réduire ceux de GC, et l'impact observé sur le métabolisme osseux ne pourrait être associé à des altérations OB-spécifiques. Parallèlement, la réinsertion du *Scarb1* dans les glandes surrénales de souris déficientes devrait rétablir les niveaux de GC/ACTH et permettre d'évaluer la proportion du phénotype attribuable à cet axe hormonal.

Récemment, l'endonucléase bactérienne *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/*CRISPR-associated* (Cas) *protein 9* suscite beaucoup d'intérêt à ce niveau puisqu'elle permet, à l'aide de séquences d'ARN guide synthétisées sur mesure, plusieurs modifications simultanées du génome (Zhang *et al*, 2014). Le système CRISPR-Cas9 permet la production de lignées cellulaires ou de zygotes génétiquement altérés sans la nécessité de la sélection clonale de cellules souches embryonnaires de la même espèce. Des insertions LoxP et des délétions/insertions de gènes spécifiques peuvent être générées dans les mêmes cellules ou zygotes (Zhang *et al*, 2014). Cette avenue permettrait la génération rapide de lignées cellulaires ou de souches murines chez lesquelles le gène *Scarb1* est spécifiquement aboli ou réintroduit dans les tissus désirés, et donc de discriminer entre les effets systémiques et OB-spécifiques du *Scarb1* sur le squelette.

5.1.6 Impact des apolipoprotéines et enzymes associées aux HDL sur le métabolisme osseux

Puisque les HDL₃ sont pauvres en apoE et riches en apoA-I et apoA-II, le chapitre IV présente des résultats de cellules exposées à ces HDL car elles sont considérées comme un ligand spécifique au SR-BI (Xu *et al*, 1997). Les résultats du chapitre IV démontrent que le SR-BI n'est pas essentiel à la liaison des HDL₃ et influence peu la sensibilité des MSC aux OxLDL, soulignant l'existence d'autres récepteurs prenant en charge ces ligands (Martineau *et al*, 2014c). De plus, les HDL₃ induisent l'expression de *Scarb1* et influencent peu la prolifération dans les MSC, suggérant un rôle autre de ce récepteur dans la réponse aux HDL. Parallèlement, les HDL₃ semble exercer un effet répresseur sur la différenciation ostéoblastique des MSC en diminuant l'expression de *Sp7*, ainsi que de *Sost* et de *Dmpl*. Ce dernier effet est à double tranchant; au niveau cellulaire, nos résultats suggèrent que les HDL₃ exercent une pression négative sur la prolifération et la différenciation ostéogénique des MSC. Cependant, au niveau tissulaire, la baisse de *Sost* induite par les HDL₃ permettrait

d'augmenter la quantité de précurseurs ostéoblastiques puisque son produit SOST en est un inhibiteur (Westendorf *et al*, 2004).

Les résultats du chapitre IV montrent que les HDL₃ tendent à réprimer la différenciation terminale des OB en OS; cependant, ces lipoprotéines ne modulent pas la prolifération des MSC (Martineau *et al*, 2014c). Plusieurs études suggèrent que les HDL ont un impact positif sur l'os (Ackert-Bicknell, 2012), notamment en stimulant la prolifération des MSC (Xu *et al*, 2012a), tel que rapporté dans d'autres types cellulaires (Pan *et al*, 2012; Sekine *et al*, 2010). Par contre, plusieurs autres études démontrent que les HDL répriment la prolifération, notamment des cellules souches hématopoïétiques (Yvan-Charvet *et al*, 2010) et des MSC (Xu *et al*, 2012b). La même ambiguïté existe parmi les études ciblant l'effet de l'apoE, une protéine se trouvant dans l'enveloppe des HDL, sur la prolifération de divers modèles cellulaires (Chen *et al*, 2005; Ishigami *et al*, 2000). Plusieurs de ces études ne discriminent pas entre les HDL₂ et les HDL₃ et traitent les cellules avec un mélange de HDL dont la proportion exacte de chaque sous-classe est indéterminée. Il est probable que les apolipoprotéines associées aux HDL influencent grandement la réponse aux sous-classes de HDL, et que cette réponse soit spécifique à chaque type cellulaire. Quoique les HDL₂ lient aussi le SR-BI, leurs apoE de surface leur procure une affinité pour l'ABCA1, le VLDLR, le LDLR ainsi que plusieurs LRP dont le LRP8 (Krimbou *et al*, 2004; Mahley *et al*, 1984; Riddell *et al*, 1999). Chacun de ces récepteurs active des voies signalétiques distinctes et les effets cellulaires subséquents peuvent être différents. Notamment, l'apoA-I et l'apoE semblent occuper des fonctions complémentaires dans les adipocytes (Bencharif *et al*, 2010) et les OB (Kalyvoti *et al*, 2013; Niemeier *et al*, 2010), l'apoA-I supportant et l'apoE inhibant leur différenciation.

L'apolipoprotéome rapporté chez les souris déficientes pour *Scarb1* démontre une proportion plus faible d'apoA-II et plus grande d'apoE dans la fraction des HDL,

mais une quantité similaire d'apoA-I (Rigotti *et al*, 1997). Ceci suggère des niveaux équivalents de HDL totales, mais que celles-ci soient en majorité des HDL₂ riches en cholestérol. Quoique les apoA-I, A-II et E soient communément étudiées, les apoA-IV, C-I, C-II, C-III et D sont aussi associées aux HDL (Mahley *et al*, 1984) et l'impact de l'ablation de *Scarb1* sur leur distribution entre HDL₂ et HDL₃ est inconnu. De plus, la distribution d'enzymes telles que la LCAT et la CETP pourraient être évaluée *via* des essais enzymatiques dans chaque sous-fraction de HDL. D'intérêt dans le métabolisme osseux, l'expression de certaines apolipoprotéines est fortement induite lors de la différenciation ostéoblastique, telles que l'apoE (Schilling *et al*, 2005) et l'apoD (résultats non publiés, appendice D). Notamment, nos résultats indiquent que les souris déficientes pour apoD présentent une ostéopénie marquée, particulièrement chez la femelle en âge avancé. Ceci nous a poussé à vérifier l'expression et la sécrétion de cette protéine par les cellules ostéoblastique. Il serait souhaitable de bien caractériser l'apolipoprotéome des OB issus de souris déficientes pour *Scarb1* ainsi que de caractériser l'effet des différentes apolipoprotéines sur ces cellules étant donné leur importance potentielle dans le métabolisme osseux. Des cellules ostéoblastiques pourraient être utilisées afin d'observer l'effet des différentes apolipoprotéines et enzymes *in vitro*. Celles ayant les effets les plus intéressants pourraient être transposées *in vivo* et, par exemple, être inoculée par injection dans des souris contrôles pour observer ensuite l'impact sur le métabolisme osseux de ces dernières.

5.2 Perspectives cliniques

5.2.1 L'utilisation de *Scarb1* comme marqueur de risque pour l'ostéoporose

Les présents résultats ouvrent la porte vers de nouvelles avenues thérapeutiques en soulignant l'importance du SR-BI et son influence sur le métabolisme osseux. Considérant nos résultats, il pourrait exister une corrélation négative entre l'expression du SR-BI et la masse osseuse chez la souris jusqu'à 4 mois. Ainsi, il

serait pertinent de déterminer le niveau d'expression ostéoblastique du SR-BI chez différentes souches de souris reconnues pour présenter des masses osseuses allant de faible (telle la souche A/J) à élevée (telle la souche C3H/HeJ) (Mouse Phenome Database, Jackson Laboratories). Une telle corrélation permettrait d'envisager le niveau d'expression du SR-BI comme un marqueur de risque pour le développement de l'ostéoporose. Des analyses par microCT indiquent que le phénotype de masse osseuse augmentée s'amenuise avec l'âge pour rejoindre des valeurs équivalentes à celles des souris WT vers 8 à 12 mois (voir appendice A); l'inhibition de l'expression de ce récepteur pourrait être une stratégie intéressante pour contrer la perte de masse osseuse, particulièrement avant l'atteinte du pic de masse osseuse alors que son effet est encore tangible. La raison pour laquelle l'impact de l'absence du SR-BI s'amenuise avec l'âge demeure inconnue. Ce point pourrait s'expliquer par un épuisement des MSC au sein de la moelle osseuse en fonction de l'âge (Stenderup *et al*, 2003). Suite à cet épuisement, et bien que la résorption osseuse soit similaire entre les souris contrôles et déficientes pour *Scarb1*, le processus de formation diminuerait graduellement en deça de la résorption et menerait à une masse osseuse équivalente entre les deux souches murines vers 8 mois. Parallèlement, puisque la densité des OS augmente en fonction de l'âge (Frost, 1963), il est possible que leur densité dans les os des souris déficientes pour *Scarb1* rejoigne des valeurs semblables à celles des souris contrôles, contribuant donc à normaliser leur phénotype. Quoiqu'à prime abord aucun indice ne laisse supposer une modification au niveau des OC en absence de *Scarb1*, nous ne pouvons exclure que le taux de résorption ne soit altéré après 4 mois et qu'il soit accru menant à une stabilisation du phénotype osseux à partir de 8 mois. Il importerait de vérifier le rôle du SR-BI dans ces cellules au fil du temps, qui pourraient augmenter leur activité en réponse à l'activité ostéoblastique accrue jusqu'à l'atteinte du pic de masse osseuse. Étant donné que la perte d'expression de *Scarb1* dans les MSC augmente leur prolifération ainsi que leur potentiel de minéralisation, son inhibition OB-spécifique pourrait théoriquement contribuer à prévenir l'ostéoporose en optimisant la masse osseuse atteinte à l'âge adulte, et peut-

être même augmenter la masse osseuse chez un sujet ostéoporotique en redonnant aux précurseurs de la moelle un plus grand potentiel prolifératif.

Une caractéristique des souris déficientes pour *Scarb1* est leur hauts niveaux de cholestérol associé aux HDL (Rigotti *et al*, 1997). De hauts taux de HDL sont généralement corrélés avec une bonne santé vasculaire; paradoxalement, l'expression du SR-BI dans les tissus périphériques est également gage de santé vasculaire (Huby *et al*, 2006). Quoique la relation positive entre la masse osseuse et les niveaux de HDL semble claire dans certaines souches murines congéniques (Ackert-Bicknell, 2012; Mouse Phenome Database, Jackson Laboratories), aucune corrélation nette n'a encore été révélée chez l'humain. Il est possible qu'un des facteurs ignorés dans les études épidémiologiques observant la corrélation entre le métabolisme des lipoprotéines et celui du squelette concerne les polymorphismes des récepteurs de lipoprotéines. Dans le cas du *Scarb1*, plusieurs polymorphismes sont répertoriés chez l'humain, tant du côté des pertes-de-fonction que celui des gains-de-fonction (Osgood *et al*, 2003; Perez-Martinez *et al*, 2003). Puisque l'ethnie semble jouer un rôle prépondérant dans les corrélations observées entre l'athérosclérose et l'ostéoporose (Farhat et Cauley, 2008), il est possible que l'incidence de ces polymorphismes soit en cause. Afin de le déterminer, des analyses bioinformatiques de banques génétiques de patients ostéoporotiques et de patients hyperlipidémiques pourraient être faites de façon croisée. Les polymorphismes identifiés en commun entre les deux banques génétiques pourraient ainsi être analysés plus avant pour voir si certains se retrouvent au niveaux des gènes codant pour les récepteurs de lipoprotéines. En fonction des résultats obtenus dans cette étude, un polymorphisme perte-de-fonction diminuant l'expression du *Scarb1* pourrait donc expliquer certaines des corrélations négatives entre les patients développant l'athérosclérose malgré de hauts taux de HDL et ne présentant pas d'ostéoporose. L'influence du SR-BI sur le squelette en fait un marqueur pronostique potentiel intéressant dont les différents polymorphismes pourraient être étudiés plus avant dans les populations humaines. Si une perte

d'expression de ce récepteur a un tel impact au niveau squelettique chez la souris, des mutations perte-de-fonction répertoriées chez l'humain pourraient également être associées à certains phénotypes osseux. Inversement, le phénotype des souris surexprimant *Scarb1* est inconnu; étant donné la diminution de l'expression de ce gène dans les OB en différenciation (voir chap. IV), nous pourrions prévoir une masse osseuse diminuée chez ces souris.

5.2.2 Modulation de la masse osseuse *via* le métabolisme des lipoprotéines

Une méthode courante pour traiter l'athérosclérose consiste à moduler la proportion plasmatique des différentes classes de lipoprotéines afin de rehausser l'effet protecteur des HDL. Notamment, la diminution des taux de LDL est une stratégie très répandue. Plusieurs études se penchent sur l'effet des statines, des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase utilisés pour réduire les taux de LDL, sur la densité minérale osseuse (Liu *et al*, 2013b). Cette avenue semble particulièrement prometteuse puisque les statines sont déjà largement employées en clinique. Cependant, le lien entre la diminution des niveaux de cholestérol par les statines et la santé osseuse n'est pas sans équivoque, notamment selon l'âge et l'alimentation des sujets, leur condition lipidique pré-existante et des variables génétiques telles que l'ethnie (Demers, 2001; Liu *et al*, 2013b). De plus, plusieurs études mentionnent des effets pléiotropiques de ces composés, indépendants du statut lipidique, principalement *via* l'inhibition des isoprénoïdes (Liao *et al*, 2005). Ceci aurait pour effet d'inhiber le métabolisme de la vitamine K, dont la forme active comprend plusieurs chaînes isoprénylées et qui est nécessaire à la gamma-carboxylation de l'OCN (Demers, 2001). L'impact de ce traitement n'est pas sans rappeler le phénotype osseux des souris déficientes pour apoE, dont la captation globale de la vitamine K par le LRP1 est compromise et dont la masse osseuse est augmentée (Niemeier *et al*, 2005; Schilling *et al*, 2005). Une autre méthode intéressante pour augmenter la proportion de HDL-C est l'administration de niacine, un composé du complexe de la vitamine B reconnu pour stimuler le RCT (Kapur *et*

al, 2008). D'autres thérapies émergentes incluent la délipidation des HDL, ainsi que l'injection de HDL exogènes ou d'apoA-I (Kapur *et al*, 2008). En supposant que ces approches n'aient d'autres effets significatifs que la hausse des niveaux de HDL-C, l'observation d'une masse osseuse augmentée chez les sujets traités appuierait la corrélation entre la BMD et les niveaux de HDL, et consisterait en une avenue thérapeutique intéressante.

Un facteur à éclaircir serait la relation entre les niveaux de HDL-C et les niveaux de particules de HDL en soit. Effectivement, de hauts taux de cholestérol associé aux HDL peuvent se distribuer dans de nombreuses particules de HDL peu chargées en cholestérol (une majorité de HDL₃), ou dans des particules de HDL moins nombreuses mais plus chargées en cholestérol (une plus grande proportion de HDL₂). Les souris déficientes pour *Scarb1* présentent des HDL anormalement gorgées en cholestérol qui sont particulièrement riches en apoE, ainsi que des niveaux normaux d'apoA-I (Rigotti *et al*, 1997). Cet enrichissement des HDL en apoE signifie que les souris déficientes pour *Scarb1* présentent un plus haut ratio HDL₂/HDL₃ que les souris normales. Paradoxalement, un haut ratio de HDL₂/HDL₃ semble protéger contre le développement de l'athérosclérose (Maeda *et al*, 2012; Sich *et al*, 1998). Cependant, cette condition chez les souris déficientes pour *Scarb1* reflète une diminution de l'efficacité du RCT, expliquant les HDL chargées en cholestérol et la susceptibilité à l'athérogénèse. Ces souris ne constituent pas le meilleur modèle pour étudier la relation entre les niveaux de HDL et la susceptibilité à l'athérosclérose car les conditions athérogènes classiques consistent en de hauts niveaux de LDL couplés à de faibles niveaux de HDL (Santamarina-Fojo *et al*, 2004). Les souris n'exprimant pas le SR-BI constituent donc un modèle d'athérogénèse atypique, rendant l'étude de la corrélation entre l'ostéoporose et l'athérosclérose délicate. Un modèle plus adéquat dans cette optique serait la souris déficiente pour le LDLR, qui présente une hypercholestérolémie spontanée à l'état basal, ainsi que des lésions athérosclérotiques sévères induites par une diète riches en lipides (Ma *et al*, 2012). Quoiqu'une ablation

OB-spécifique du *Scarb1* permettrait l'étude des effets SR-BI-indépendants des HDL sur ces cellules, l'abolition globale de l'expression de ce gène apporte de nombreux facteurs confondants, tels que les niveaux d'ACTH et de leptine.

5.3 Conclusions

Nous avons démontré que le SR-BI occupe un rôle important dans la régulation du métabolisme osseux (Figure 5.1). Premièrement, l'absence de ce récepteur influence la physiologie osseuse en altérant les fonctions des glandes surrénales et en provoquant une hausse constitutive d'ACTH, reconnue pour ses effets ostéoanaboliques. Deuxièmement, le SR-BI occupe des fonctions différentes selon le genre, son absence se traduisant par une augmentation de la sécrétion de la leptine par les adipocytes chez les femelles seulement. Finalement, le SR-BI influence la prolifération et la différenciation des OB en modulant l'expression des cyclines, des marqueurs ostéoblastiques ainsi que de divers acteurs de la voie Wnt. Ces axes pourraient être manipulés dans le but de moduler la masse osseuse et ainsi d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans les désordres causant une faible masse osseuse.

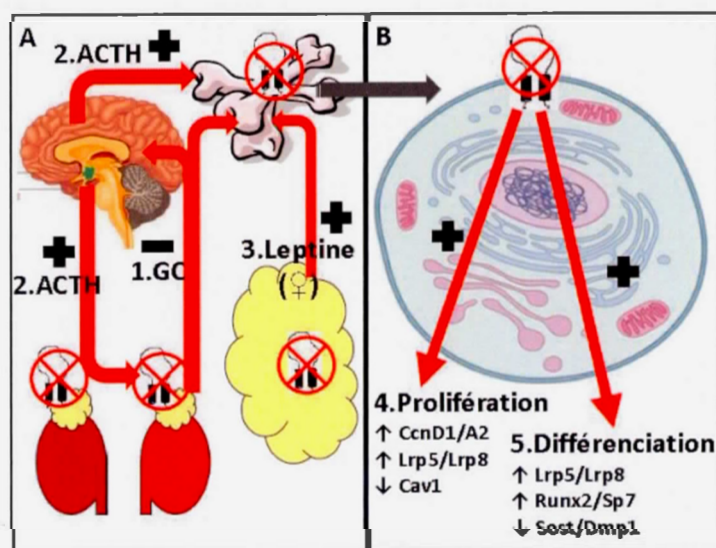


Figure 5.1 Résumé des effets de la déficience pour *Scarb1* sur le métabolisme osseux. **A.** Impacts systémiques : 1. baisse des GC sécrétés par les surrénales; 2. hausse de l'ACTH sécrété par l'hypophyse et 3. de la leptine sécrétée par le tissu adipeux (chez les femelles seulement). **B.** Impacts cellulaires : 4. hausse de la prolifération et 5. de la différenciation.

APPENDICE A

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : ANALYSES MICROCT DES FÉMURS DE
SOURIS DÉFICIENTES POUR *SCARB1* DE 2 À 12 MOIS

A.1 Impact de l'âge et du genre sur l'architecture osseuse des souris déficientes pour *Scarb1*

A.1.1 Variations de l'architecture trabéculaire et corticale en fonction de l'âge

Au cours de la croissance, la masse osseuse augmente jusqu'à l'atteinte du pic osseux, puis diminue avec l'âge. Chez les souris contrôles, les valeurs du volume relatif osseux affichent une courbe typique à la hausse jusqu'à l'atteinte de la maturité squelettique (8 mois), puis baissent jusqu'à 12 mois reflétant une hausse de résorption osseuse. En parallèle, l'épaisseur et l'espace trabéculaires augmentent progressivement, tandis que le nombre de trabécules au contraire diminue. (Fig. A.1A et A.2A). Au niveau cortical, une tendance similaire s'observe avec le volume absolu et le diamètre cortical, qui augmentent jusqu'à 8 mois, puis diminuent en âge avancé; le diamètre endostéal tend plutôt à augmenter progressivement en fonction de l'âge (Fig. A.1B et A.2B).

Chez les souris mutantes, ces courbes de croissance osseuse semblent décalées en bas âge (voir les colonnes noires des Fig. A.1 et A.2), particulièrement au niveau de l'os trabéculaire. Jusqu'à 4 mois, les valeurs du volume relatif osseux et du nombre de trabécules sont systématiquement plus élevées chez les souris déficientes pour *Scarb1*. En parallèle, l'espace trabéculaire est significativement plus faible, tandis que l'épaisseur trabéculaire n'est pas visiblement affectée. Au niveau cortical, aucune différence n'est notée chez les mâles mutants, sauf peut-être une hausse du diamètre endostéal à 12 mois. Par contre, les femelles déficientes pour *Scarb1* présentent une augmentation du volume et du diamètre corticaux jusqu'à 2 mois, après quoi ces valeurs rejoignent celles des souris contrôles. Dans les deux cas, le diamètre endostéal ne semble pas affecté par le génotype.

Non seulement les souris mutantes atteignent-elles un pic osseux supérieur, celui-ci semble survenir plus tôt que celui des souris contrôles.

A.1.2 Impact du genre sur l'architecture trabéculaire et cortical des souris déficientes pour *Scarb1*

Un dimorphisme sexuel osseux apparaît normalement à la puberté chez la plupart des mammifères, dont l'humain et la souris. Chez ces dernières, ce dimorphisme apparaît vers l'âge de 2 mois : les mâles ont alors une masse osseuse trabéculaire plus élevée (de l'ordre de 8 %, vs 5 % chez les femelles) ainsi qu'un plus important volume cortical (environ 0.23mm^3 chez les mâles pour 0.18mm^3 chez les femelles). Cette différence se maintient normalement toute la vie, et peut même être accentuée en âge avancé par l'accélération de la perte de masse osseuse chez les femelles suite à la ménopause. Cependant, la déficience pour *Scarb1* semble grandement réduire le dimorphisme sexuel chez la souris. Effectivement, le volume osseux relatif au niveau médullaire est sensiblement le même chez les mâles et les femelles (aux alentours de 10 % à 2 et 4 mois); il en va ainsi pour les autres paramètres, soit l'épaisseur, l'espace et le nombre de trabécules.

La déficience pour *Scarb1* provoque des altérations du dimorphisme sexuel osseux chez la souris, notamment en amenuisant les différences de masse osseuse normalement observées entre les mâles et les femelles. Cette disparition des différences liées au genre semble due au fait que la déficience pour *Scarb1* affecte plus fortement les femelles, qui gagnent plus de masse osseuse par rapport aux femelles contrôles.

A.2 Légende des figures

Figure A.1. Analyses microCT des fémurs de souris déficientes pour *Scarb1* mâles âgés de 2 à 12 mois.

(A) Architecture trabéculaire des métaphyses distales fémorales de souris mâles déficientes pour *Scarb1*; illustrées sont les valeurs moyennes du volume osseux relatif (%), de l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th, μm), de l'espace trabéculaire (Tb.Sp, μm) et du nombre de trabécules par mm (Tb.N, mm^{-1}). Le panneau inférieur droit montre des images représentatives de souris de 2 mois; les volumes analysés sont définis par les deux lignes, soit un segment de 2 mm, 0.5 mm sous la plaque de croissance. (B) Structure corticale des diaphyses fémorales des mêmes souris, montrant les valeurs moyennes pour le volume cortical absolu (BV, mm^3), le diamètre cortical (Ct.Dm, μm) et le diamètre endostéal (Es.Dm, μm). Des images brutes représentative des volumes d'intérêts (soit un segment de 0.5 mm, 2.5 mm sous la plaque de croissance) sont présentées dans le panneau inférieur pour des souris de 2 mois. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM de 8 à 12 individus par groupe. Différences significatives : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ *versus* les souris contrôle (WT), 2-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Bonferroni.

Figure A.2. Analyses microCT des fémurs de souris déficientes pour *Scarb1* femelles âgées de 2 à 12 mois.

(A) Architecture trabéculaire des métaphyses distales fémorales de souris femelles déficientes pour *Scarb1*; illustrées sont les valeurs moyennes du volume osseux relatif (%), de l'épaisseur trabéculaire (Tb.Th, μm), de l'espace trabéculaire (Tb.Sp, μm) et du nombre de trabécules par mm (Tb.N, mm^{-1}). Le panneau inférieur droit montre des images représentatives pour des individus de 2 mois; les volumes analysés sont définis par les deux lignes, soit un segment de 2 mm; 0.5 mm sous la plaque de croissance. (B) Analyse de la structure corticale des diaphyses fémorales des mêmes souris, montrant les valeurs moyennes pour le volume cortical absolu (BV, mm^3), le

diamètre cortical (Ct.Dm, μm) et le diamètre endostéal (Es.Dm, μm). Des images brutes représentative des volumes d'intérêts (soit un segment de 0.5 mm, 2.5 mm sous la plaque de croissance) sont présentées dans le panneau inférieur pour des souris de 2 mois. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM de 4 à 12 individus par groupe. Différences significatives : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ *versus* les souris contrôle (WT), 2-way ANOVA suivi d'un test post-hoc de Bonferroni.

Figure A.1 Analyses microCT des fémurs de souris déficientes pour *Scarb1* mâles entre les âges de 2 à 12 mois

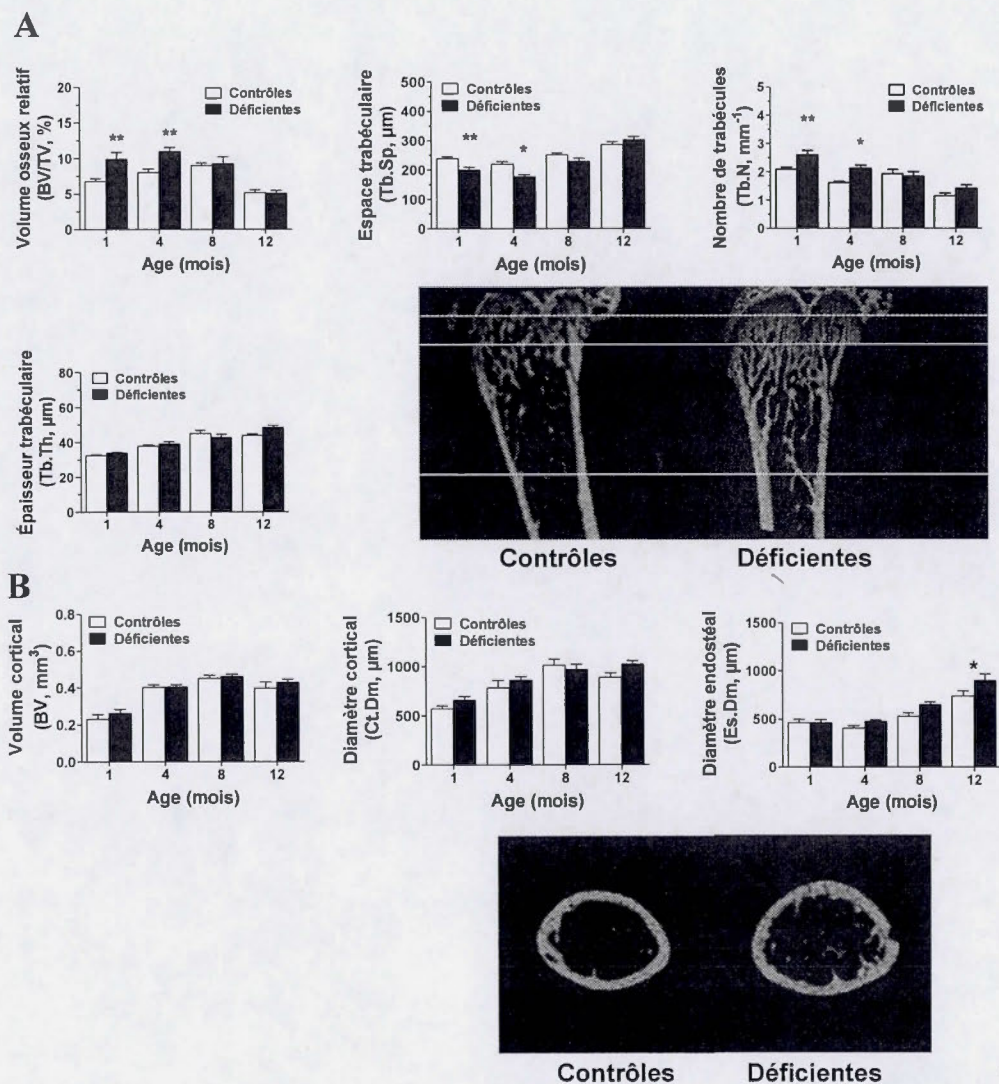
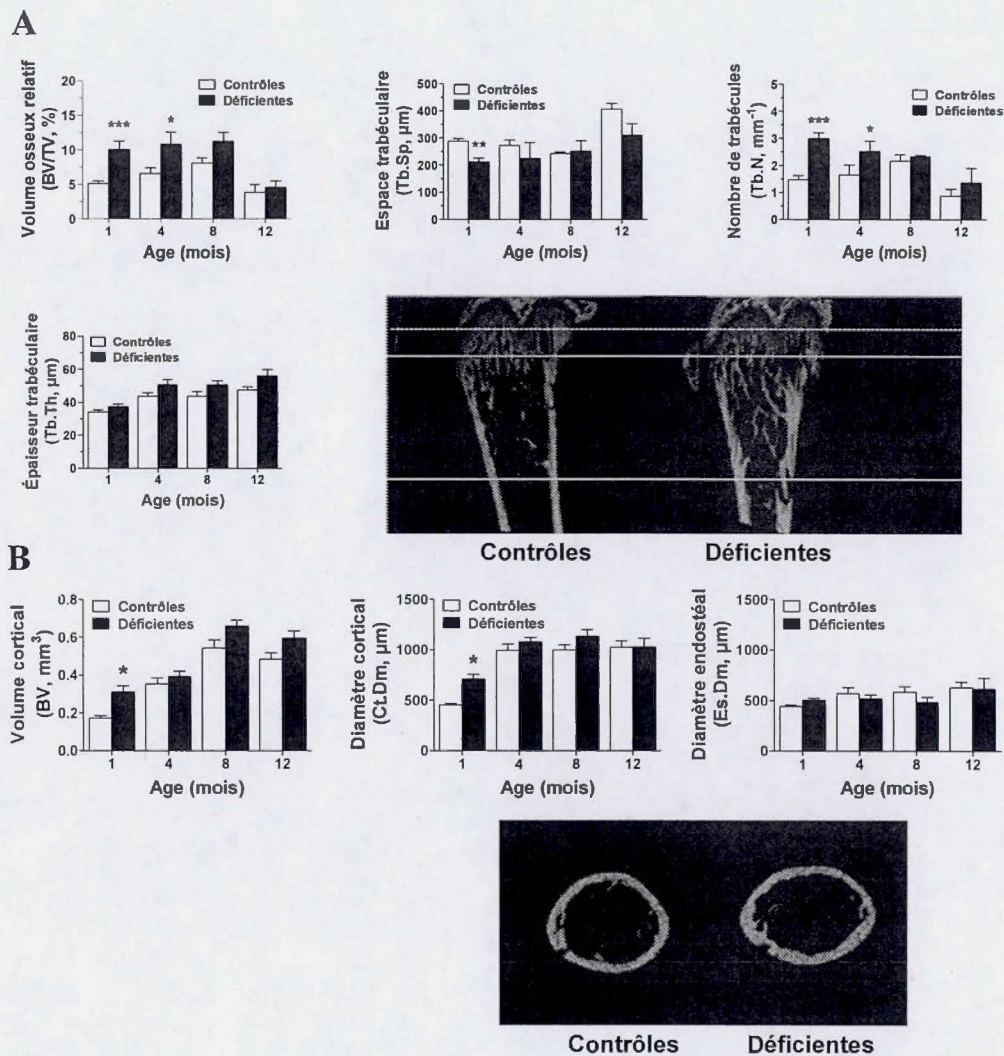


Figure A.2 Analyses microCT des fémurs de souris déficientes pour *Scarb1* femelles entre les âges de 2 à 12 mois.



APPENDICE B

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : NIVEAUX PLASMATIQUES
D'ADIPONECTINE CHEZ LES SOURIS DÉFICIENTES POUR *SCARB1*

B.1 Effet de la déficience pour *Scarb1* sur les niveaux plasmatiques d'adiponectine

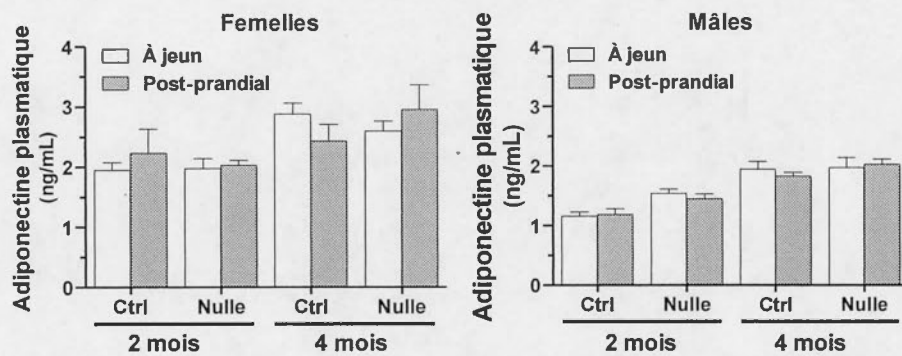
Les résultats du chapitre III indiquent que la déficience pour *Scarb1* provoque une hausse constitutive des niveaux plasmatiques de leptine; un facteur plasmatique fréquemment dosé de pair avec celle-ci est l'adiponectine, une autre adipokine sécrétée par le tissu adipeux. L'ablation génétique du *Scarb1* n'a apparemment aucune influence sur les taux d'adiponectine circulante, du moins jusqu'à l'âge de 4 mois, peu importe le genre. Aussi, l'état de satiété ne semble pas avoir d'impact sur les taux plasmatique de l'adiponectine; les conditions propices modulant spécifiquement les niveaux de cette hormone devraient être vérifiées. Il n'est pas totalement exclu que des altérations de cet axe se manifestent plus tardivement dans la vie de ces souris. Il est également intéressant de constater que les niveaux de cette adipokine sont plus élevés chez les femelles. Considérant que le SR-BI affecte plus fortement les femelles en bas âge dans notre système, ces résultats tendent à démontrer que cet axe n'est pas affecté par la déficience pour *Scarb1*.

B.2 Légende de la figure

Figure B.1. Niveaux plasmatiques d'adiponectine chez les souris mâles et femelles déficientes pour *Scarb1* âgées de 2 et 4 mois.

Les niveaux plasmatiques d'adiponectine (ng/mL) ont été mesurés par ELISA chez les souris contrôles (Ctrl) et mutantes (Nulle) suite à un jeûne de 16 h (À jeun) ou une prise alimentaire (Post-prandial), et ce pour les mâles et les femelles de 2 et 4 mois. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM de 4 individus par groupe. Aucune différence significative n'est observée.

Figure B.1 Niveaux plasmatiques d'adiponectine chez les souris mâles et femelles déficientes pour *Scarb1* âgées de 2 et 4 mois.



APPENDICE C

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : EFFETS DE L'ACTH ET DE LA LEPTINE
SUR LA DISTRIBUTION DE LA CAVÉOLINE-1 DANS LES FRACTIONS
RICHES EN CAVÉOLES DES OSTÉOBLASTES

C.1 Effets de l'ACTH et de la leptine sur la stabilité des cavéoles dans les OB

Les signalosomes formés par les cavéoles sont des structures fluides en constante fluctuation. Notamment, diverses protéines, dont la cavéoline-1, peuvent être recrutées ou exclues des signalosomes en réponse à différents stimuli. Une façon de vérifier si la cascade signalétique initiée par un certain facteur dépend d'un signalosome, il est possible de traiter les cellules et d'en isoler les fractions riches en cavéoles pour en observer la distribution des protéines. Généralement, la cavéoline-1 est utilisée pour identifier les fractions riches en cavéoles (voir la condition CTL); il est possible d'estimer la proportion de cavéoles en comparant l'intensité des bandes dans les fractions 4-5 à l'intensité combinée des bandes dans toutes les fractions.

Lors d'un traitement à l'ACTH, les cellules de la lignée MC3T3-E1 présentent un fort enrichissement des fractions cavéolaires (voir condition +ACTH); ceci pourrait indiquer la nécessité de recruter des protéines dans un signalosome en réponse à cette hormone, en l'occurrence le MC2R et autres intermédiaires signalétiques nécessaires. Au contraire, le traitement à la leptine ne semble pas provoquer l'enrichissement des fractions cavéolaires dans ces cellules (voir condition +LEPTIN). Quoique les fractions 4-5 présentent tout de même un peu de cavéoline-1, celle-ci est majoritairement délocalisée dans les fractions 6 à 9 suggérant plutôt une déstabilisation des cavéoles suite à ce traitement. La relation entre le récepteur de la leptine (ObR) et les cavéoles est peu documenté; peut-être est-il maintenu inactif par la cavéoline-1.

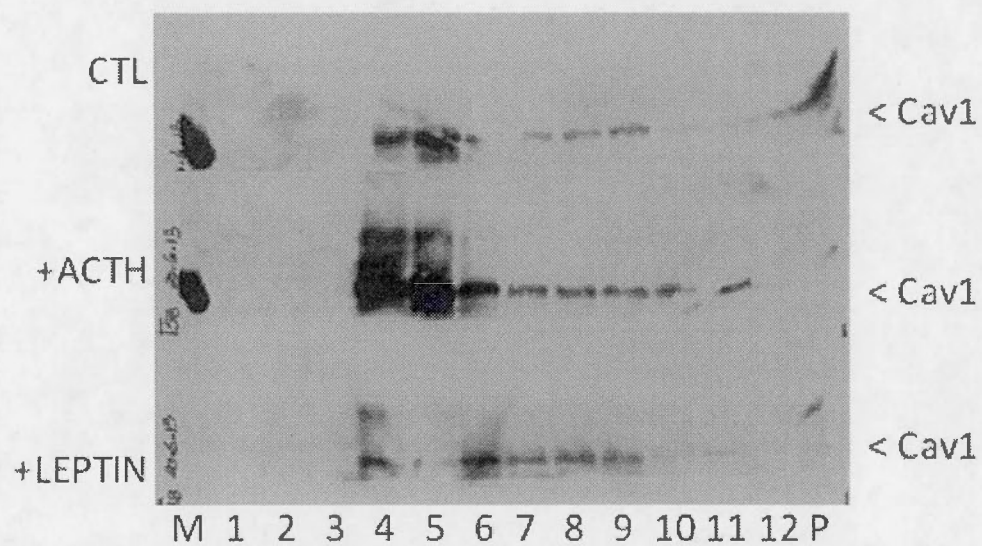
Étant donné leur effet sur la distribution membranaire de la cavéoline-1, l'ACTH et la leptine semblent initier des cascades signalétiques dépendantes des signalosomes. Des anomalies au niveau de l'expression/distribution de la cavéoline-1 pourrait donc avoir un impact sur la réponse cellulaire à ces stimuli.

C.2 Légende de la figure

Figure C.1 Effets de l'ACTH et de la leptine sur la distribution de la cavéoline-1 dans les fractions membranaires riches en cavéoles de cellules otéoblastiques.

Gradients de sucrose discontinus de lysats cellulaires de MC3T3-E1 en conditions contrôle ou préalablement traitées pendant 48 h à l'ACTH (10 nM) ou à la leptine (100 ng/mL). L'immunobuvardage a été effectué sur les 12 fractions (1 à 12) et le précipitat (P), récoltés par aliquots de 1mL à partir du haut du tube à centrifugation. Les fractions 4 et 5 enrichies en cavéoline-1 représentent les cavéoles; les fractions supérieures (1 à 3) sont généralement vides, les fractions inférieures (6 à 12) englobe les protéines cytosoliques, et le précipitat (P) comprend des protéines membranaires non-cavéolaires, ainsi que des protéines nucléaires. Une seule expérience. M = marqueur de poids moléculaire.

Figure C.1 Effets de l'ACTH et de la leptine sur la distribution de la cavéoline-1 dans les fractions riches en cavéoles des cellules MC3T3-E1.



APPENDICE D

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : EXPRESSION DE L'APOLIPOPROTÉINE D DANS LES CELLULES OSTÉOBLASTIQUES

D.1 Expression et sécrétion de l'apoD dans les OB en cours de différenciation

L'apolipoprotéine D (apoD) est une protéine glycosylée de 29 kDa de la famille des lipocalines; quoique celle-ci soit souvent associée aux HDL, son rôle dans le métabolisme des lipoprotéines est peu documenté. L'apoD est principalement exprimé dans le système nerveux, mais également à divers degrés dans de nombreux tissus périphériques dont l'os (observations non publiées). À l'état basal, l'expression génique et protéique de l'apoD sont faibles dans les précurseurs ostéoblastiques MC3T3-E1. Cependant, un traitement ostéogénique augmente progressivement son expression (Fig. D.1A et B). De plus, les MC3T3-E1 sécrètent activement l'apoD, tel qu'illustré par l'immunobuvardage de milieux de culture conditionnés (Fig. D.1C). Détail intéressant, l'ApoD sécrétée est fortement glycosylée, ce qui semble se manifester par un poids moléculaire apparent plus élevé en C, comparativement en B, qui montre la forme intracellulaire non glycosylée. Les fonctions de l'apoD dans les OB et sa distribution dans le tissu osseux sont pour l'instant inconnues.

D.2 Impact du genre et de la déficience pour *Scarb1* sur l'expression génique de l'apoD dans des cultures primaires de MSC.

La prochaine étape était de confirmer l'expression de l'apoD dans les cultures primaires des MSC de souris. Un fait intéressant est que l'apoD semble plus fortement exprimée dans les cellules issues de femelles (Fig. D.2A). L'effet de la déficience pour *Scarb1* a ensuite été explorée; la plus forte expression de l'apoD dans les cellules de femelles a été confirmé (Fig. D.2B). Cependant l'absence du SR-BI ne paraît pas affecter l'expression de l'apoD.

D.3 Légende des figures

Figure D.1. Expression et sécrétion de l'apoD dans les cellules MC3T3-E1 au cours d'un traitement ostéogénique.

(A) Analyse par PCR relative en temps réel de l'expression génique de l'*apoD* (en bleu) et de la beta-microglobuline (*B2m*, en vert) dans des cellules MC3T3-E1 en cours de différenciation (Ostéogénique) vs en conditions contrôles (Contrôle) aux jours 0, 7, 14 et 21 post-confluence. Les valeurs sont les moyennes \pm SEM de 2 expériences indépendantes. (B et C) Immunobuvardage de l'apoD à partir de lysats cellulaires (B, vs contrôle beta-actine) et de milieux de culture (C, vs contrôle Amido Black) des cellules traitées selon les conditions décrites en (A). Cette expérience a été faite de façon indépendante à 2 reprises.

Figure D.2. Expression de l'apoD dans les MSC de souris contrôles et déficientes pour *Scarb1*.

(A) Analyse par PCR semi-quantitative de l'expression de l'*apoD* vs *B2m* dans les cultures primaires de MSC issues de souris mâles ou femelles contrôles. Il y a 2 souris de chaque genre (n=2). (B) Analyse par PCR relative en temps réel de l'expression de l'*apoD* vs *B2m* dans des cultures primaires de MSC issues de souris contrôles et déficientes pour *Scarb1* mâles ou femelles. Cette expérience a été conduite de façon indépendante à 2 reprises.

Figure D.1 Expression et sécrétion de l'apoD dans les cellules MC3T3-E1 au cours d'un traitement ostéogénique.

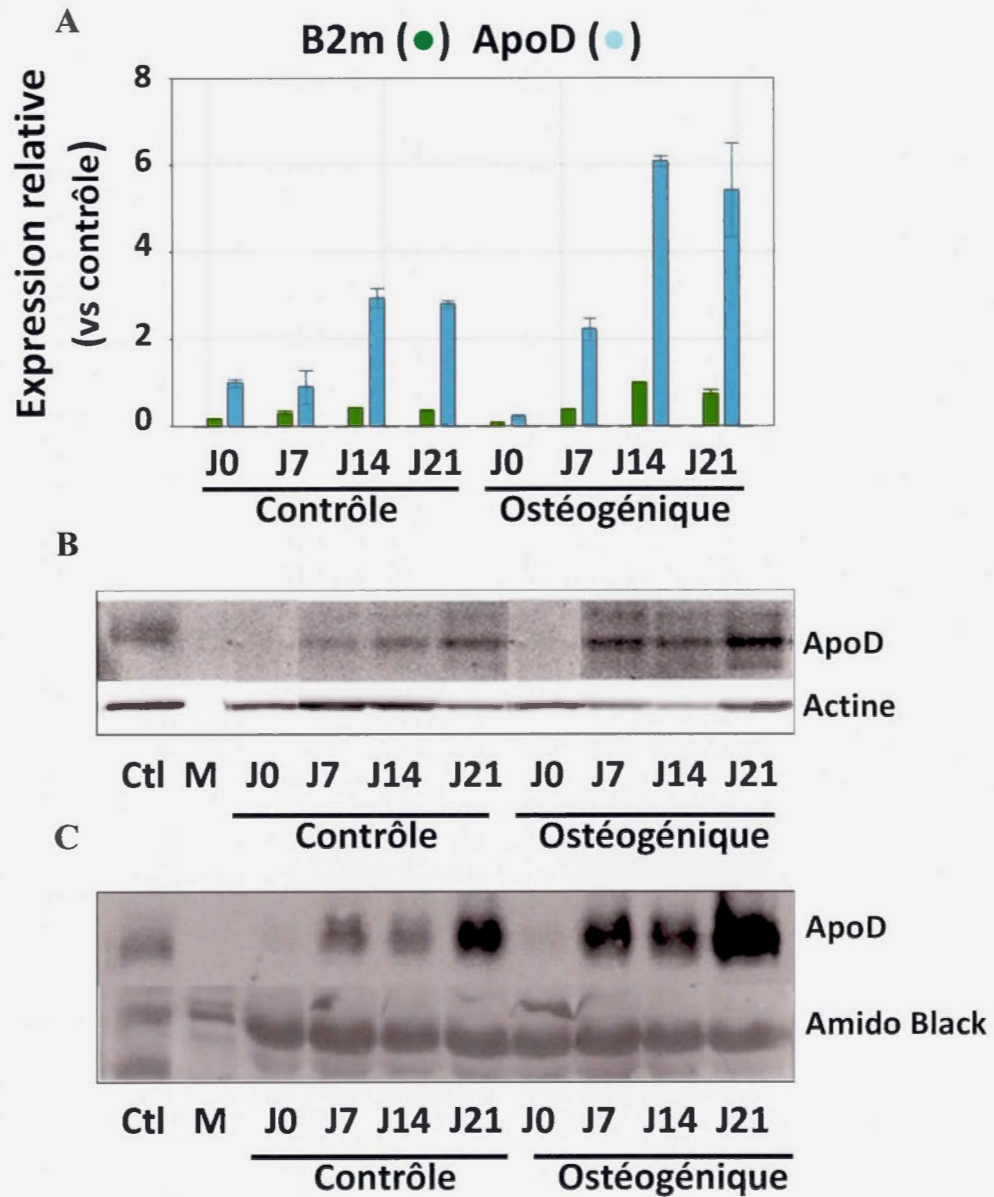
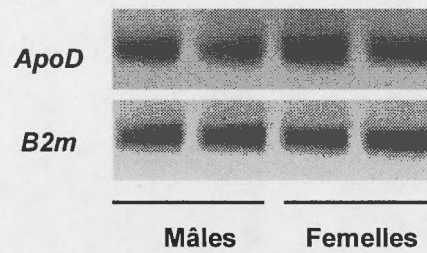
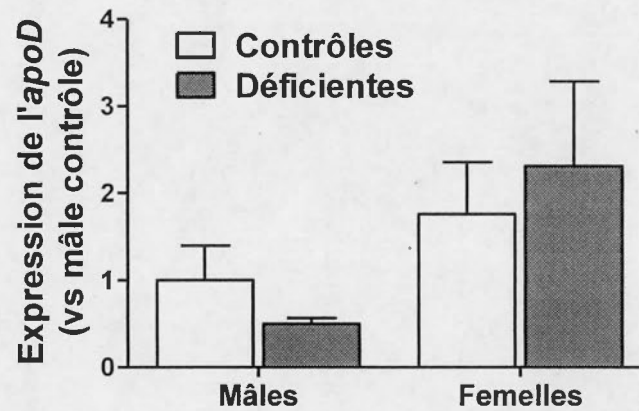


Figure D.2 Expression de l'apoD dans les MSC de souris contrôles et déficientes pour *Scarb1*.

A



B



RÉFÉRENCES

- Abplanalp W, Scheiber MD, Moon K, Kessel B, Liu JH, Subbiah MTR, 2000. Evidence for the role of high density lipoproteins in mediating the antioxidant effect of estrogens. *Eur J Endocrinol.* 142:79–83.
- Ackert-Bicknell CL, 2012. HDL cholesterol and bone mineral density: is there a genetic link? *Bone.* 50:525-533.
- Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M, 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* 269:21003-21009.
- Acton S, Rigotti A, Lanschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M, 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 271:518–520.
- Adami S, Braga V, Zamboni M, Gatti D, Rossini M, Bakri J, Battaglia E, 2004. Relationship between lipids and bone mass in 2 cohorts of healthy women and men. *Calc Tiss Int.* 74:136-142.
- Afghani A, Goran MI, 2009. Interrelationship between abdominal adiposity, leptin and bone mineral content in overweight latino children. *Horm Res.* 72:82-89.
- Agueda L, Velazquez-Cruz R, Urreizti R, Yoskovitz G, Sarrion P, Jurado S, Guerri R, Garcia-Giralt N, Nogues X, Mellibovsky L, Diez-Perez A, Marie PJ, Balcells S, Grinberg D, 2011. Functional relevance of the BMD-associated polymorphism rs312009: novel involvement of RUNX2 in LRP5 transcriptional regulation. *J Bone Miner Res.* 26:1133-1144.
- Aguirre J, Buttery L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Fernandez de Marticorena I, Hukkanen M, Huang P, MacIntyre I, Polak J, 2001. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am J Pathol.* 158:247-257.
- Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson M, 2003. Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med.* 349:327–34.

- Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodriguez-Crespo I, 2011. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *BBA Biomemb.* 1808:2981–2994.
- Altmann SW, Davis HR, Jr., Yao X, Lavery M, Compton DS, Zhu LJ, Crona JH, Caplen MA, Hoos LM, Tetzloff G, Priestley T, Burnett DA, Strader CD, Graziano MP, 2002. The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption. *Biochim Biophys Acta.* 1580:77-93.
- Amizuka N, Kwan MY, Goltzman D, Ozawa H, White JH, 1999. Vitamin D3 differentially regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor expression in bone and cartilage. *J Clin Invest.* 103:373–381.
- Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino ACW, O'Loughlin PD, Morris HA, 2007. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone.* 40:1517–1528.
- Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Andersen RG, Xu S, Krieger M, 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem.* 272:13242-13249.
- Badeau RM, Metso J, Tikkanen MJ, Jauhiainen M, 2007. High-density lipoprotein-associated 17 β -estradiol fatty acyl ester uptake by Fu5AH hepatoma cells: implications of the roles of scavenger receptor class B, type I and the low-density lipoprotein receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1771:1329-1334.
- Baker N, Zhang G, You Y, Tuan RS, 2012. Caveolin-1 regulates proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 113:3773-3787.
- Balasch J, 2003. Sex steroids and bone: a current perspective. *Hum Reprod Update.* 9:207-222.
- Balemans W, Devogelaer JP, Cleiren E, Piters E, Caussin E, Van Hul W, 2007. Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res.* 22:708-716.
- Banks LM, Lees B, MacSweeney JE, Stevenson JC, 1994. Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in post-menopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? *Eur J Clin Invest.* 24:813-817.

- Barengolts EI, Berman M, Kukreja SC, Kouznetsova T, Lin C, Chomka EV, 1998. Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calc Tiss Int.* 62:209-213.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK, 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature.* 341:162-164.
- Bencharif K, Hoareau L, Murumalla RK, Tarnus E, Tallet F, Clerc RG, Gardes C, Cesari M, Roche R, 2010. Effect of apoA-I on cholesterol release and apoE secretion in human mature adipocytes. *Lipids Health Dis.* 9:75.
- Bennett N, Hooper JD, Lee CS, Gobe GC, 2009. Androgen receptor and caveolin-1 in prostate cancer. *IUBMB Life.* 61:961-970.
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ, 1995. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 91:2488-2496.
- Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE, 2004. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone.* 35:842-849.
- Bilezikian JP, Brandi ML, Rubin M, Silverberg SJ, 2005. Primary hyperparathyroidism: new concepts in clinical, densitometric and biochemical features. *J Intern Med.* 257:6-17.
- Bist A, Fielding PE, Fielding CJ, 1997. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10693-10698.
- Björnström L, Sjöberg M, 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 9:833-842.
- Blaak E, 2001, Gender differences in fat metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4:499-502.
- Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH, 2002. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J.* 364:329-341.
- Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA, 2000. Nitric Oxide Regulation of Free Radical- and Enzyme-Mediated Lipid and Lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1707-1715.

- Böhm M, Grässel S, 2012. Role of proopiomelanocortin-derived peptides and their receptors in the osteoarticular system: from basic to translational research. *Endocr Rev.* 33:623-651.
- Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R, 2009. The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud Publica Mex.* 51:S5-S17.
- Boström KI, Rajamannan NM, Towler D, 2011. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res.* 109:564-577.
- Boudin E, Fijalkowski I, PETERS E, Van Hul W, 2013. The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 43:220-240.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Braun A, Trigatti BL, Post MJ, Sato K, Simons M, Edelberg JM, Rosenberg RD, Schrenzel M, Krieger M, 2002. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res.* 90:270-276.
- Brennan-Speranza TC, Hénneicke H, Gasparini SJ, Blankenstein KI, Heinevetter U, Cogger VC, Svistounov D, Zhang Y, Cooney GJ, Buttgerit F, Dunstan CR, Gundberg C, Zhou H, Seibel MJ, 2012. Osteoblasts mediate the adverse effects of glucocorticoids on fuel metabolism. *J Clin Invest.* 122:4172-4189.
- Brissette L, Falstraalt L, Lafond J, Izem L, 1996. The selective uptake of the cholesteryl esters of low density lipoproteins parallels the activity of protein kinase C. *Biochim Biophys Acta.* 1301:133-140.
- Brodeur MR, Luangrath V, Bourret G, Falstraalt L, Brissette L, 2005. Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J Lipid Res.* 46:687-696.
- Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Ouellet P, Moreau R, 2008a. Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic Biol Med.* 44:506-517.

- Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Moreau R, 2008b. HDL3 reduces the association and modulates the metabolism of oxidized LDL by osteoblastic cells: a protection against cell death. *J Biol Chem.* 105:1374-1385.
- Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Luangrath V, Moreau R, 2008c. Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL₃. *J Bone Miner Res.* 23:326-337.
- Brown MS, Goldstein JL, 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (7): 3330-7.
- Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo WL, Li R, Song R, Bradley WA, Gianturco SH, 2000. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: Cloning, expression, and atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci.* 97:7488-7493.
- Brundert M, Ewert A, Heeren J, Behrendt B, Ramakrishnan R, Greten H, Merkel M, Rinninger F, 2005. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 25:143-148.
- Brundert M, Heeren J, Merkel M, Carambia A, Herkel J, Groitl P, Dobner T, Ramakrishnan R, Moore KJ, Rinninger F, 2011. Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J Lipid Res.* 52:745-758.
- Callewaert F, Sinnesael M, Gielen E, Boonen S, Vanderschueren D, 2010. Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J Endocrinol.* 207:127-134.
- Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA, 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res.* 39:777-788.
- Calvo D, Vega M A. 1993. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem.* 268:18929-18935.
- Cammisotto PG, Bukowiecki LJ, 2002. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C244-C250.
- Cammisotto PG, Bendayan M, 2007. Leptin secretion by white adipose tissue and gastric mucosa. *Histol Histopathol.* 22:199-210.

- Canalis E, Economides AN, Gazzero E, 2003. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Rev.* 24:218-235.
- Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP, 2007. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int.* 18:1319-1328.
- Cantiani L, Manara MC, Zucchini C, De Sanctis P, Zuntini M, Valvassori L, Serra M, Olivero M, Di Renzo MF, Colombo MP, Picci P, Scotlandi K, 2007. Caveolin-1 reduces osteosarcoma metastases by inhibiting c-src activity and met signaling. *Cancer Res.* 67:7675-7685.
- Casabiell X, Piñeiro V, Peino R, Lage M, Camiña J, Gallego R, Vallejo LG, Dieguez C, Casanueva FF, 1998. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue *in vitro*: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:2149-2155.
- Charlton-Menys V, Durrington PN, 2006. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol.* 93:27-42.
- Chen Z, Saffitz JE, Latour MA, Schonfeld G, 1999. Truncated apoB-70.5-containing lipoproteins bind to megalin but not the LDL receptor. *J Clin Invest.* 103:1419-1430.
- Chen YC, Pohl G, Wang TL, Morin PJ, Risberg B, Kristensen GB, Yu A, Davidson B, Shih IeM, 2005. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer. *Cancer Res.* 65:331-337.
- Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B, 2000. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation.* 101:2411-2417.
- Cho SW1, Yang JY, Her SJ, Choi HJ, Jung JY, Sun HJ, An JH, Cho HY, Kim SW, Park KS, Kim SY, Baek WY, Kim JE, Yim M, Shin CS, 2011. Osteoblast-targeted overexpression of PPAR γ inhibited bone mass gain in male mice and accelerated ovariectomy-induced bone loss in female mice. *JBMR* 26:1939-1952.
- Cirmanova V, Bayer M, Starka L, Zajickova K, 2008. The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res.* 57 Suppl 1:S143-S151.
- Clarke B, 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3:S131-S139.

- Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP, 2004. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 84:1341-1379.
- Collares CVA, Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Franca SN, Pereira LA, Marta M, Soares MMS, Elias J Jr, Clark AJ, de Castro M, Elias LLK, 2008. Heterogeneity in the molecular basis of ACTH resistance syndrome. *Eur J Endocrinol.* 159:61–68.
- Cong R, Feng YM, Wang CB, Zong YQ, Deng YZ, Feng ZC, 2000. Regulation of expression of low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rabbit aortic smooth muscle cells. *Chin J Biochem Mol Biol.* V16(04):510-513
- Conradie MM, de Wet H, Kotze1 DDR, Burrin JM, Hough FS, Hulley PA, 2007. Vanadate prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblasts *in vitro* and osteocytes *in vivo*. *J Endocrinol.* 195:229–240.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P, 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 49:507-521.
- Cornish J, Callon KE, Bava U, Lin C, Naot D, Hill BL, Grey AB, Broom N, Myers DE, Nicholson GC, Reid IR, 2002. Leptin directly regulates bone cell function *in vitro* and reduces bone fragility *in vivo*. *J. Endocrinol.* 175:405-415.
- Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking MJ, Helfrich MH, 2011. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci.* 124:991-998.
- Cuchel M, Rader DJ, 2006. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 113:2548–55.
- Cunningham J, Sprague SM, Cannata-Andia J, Coco M, Cohen-Solal M, Fitzpatrick L, Goltzmann D, Lafage-Proust MH, Leonard M, Ott S, Rodriguez M, Stehman-Breen C, Stern P, Weisinger J, 2004. Osteoporosis in chronic kidney disease. *Am J Kid Dis.* 43:566–571.
- Datta NS, Pettway GJ, Chen C, Koh AJ, McCauley LK, 2007. Cyclin D1 as a target for the proliferative effects of PTH and PTHrP in early osteoblastic cells. *J Bone Miner Res.* 22:951-64.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS, 2008. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 61:577-587.
- Davis EK, Zou Y, Ghosh A, 2008. Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Dev.* 3:32

- Day TF, Yang Y, 2008. Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am.* 90:19-24.
- Demers LL, 2001. Boning up (or down) on statins. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 21:1565-1566
- Diez-Perez A, Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian JP, Compston JE, Cummings SR, Eastell R, Eriksen EF, Gonzalez-Macias J, Liberman UA, Wahl DA, Seeman E, Kanis JA, Cooper C, 2012. Treatment failure in osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 23:2769-2774.
- Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TP, 2003. Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci.* 100:11201-11206.
- Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, Shah PK, Rajavashisth TP, 2004. Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocrine Rev.* 25:629-672.
- Dole VS, Matuskova J, Vasile E, Yesilaltay A, Bergmeier W, Bernimoulin M, Wagner DD, Krieger M, 2008. Thrombocytopenia and platelet abnormalities in high density lipoprotein receptor deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1111-1116.
- Dore RK, 2010. How to prevent glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clev Clin J Med.* 77:529-36.
- Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G, 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 100:197-207.
- Duka A, Fotakis P, Georgiadou D, Katefides A, Tzavlaki K, von Eckardstein L, Stratikos E, Kardassis D, Zannis VI, 2012. ApoA-IV promotes the biogenesis of apoA-IV-containing HDL particles with the participation of ABCA1 and LCAT. *J Lipid Res.* 54:107-115.
- Eijken M, Koedam M, van Driel M, Buurman CJ, Pols HA, van Leeuwen JP, 2006. The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Mol Cell Endocrinol.* 248:87-93.
- Erben RG, 1997. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 45:307-313.

- Ezzat Y, Hamdy K, 2010. The frequency of low bone mineral density and its associated risk factors in patients with inflammatory bowel diseases. *Int J Rheum Dis.* 13:259-265.
- Farese RV Jr, Veniant MM, Cham CM, Flynn LM, Pierot V, Loring JF, Traber M, Ruland S, Stokowski RS, Huszar D, Young SG, 1996. Phenotypic analysis of mice expressing exclusively apolipoprotein B-48 or apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:6393-6398.
- Farhat GN, Cauley J, 2008. The link between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 5:19-34.
- Fazio S, Linton MF, 2004. Unique pathway for cholesterol uptake in fat cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1538-1549.
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SFA, Silverstein RL, 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem.* 274:19055-19062.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL, 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 108:785-791
- Feng H, Guo L, Wang D, Gao H, Hou G, Zheng Z, Ai J, Foreman O, Daugherty A, Li XA, 2011. Deficiency of SR-BI leads to impaired lymphocyte homeostasis and autoimmune disorders in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31:2543-2551.
- Feng Y, Schouteden S, R. Geenens R, Van D, Herijgers P, Holvoet P, Van Veldhoven PP, Verfaillie CM, 2012. Hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and differentiation is differentially regulated by high-density and low-density lipoproteins in mice. *PLoS One.* 7:e47286.
- Fielding CJ, 1992. Lipoprotein receptors, plasma cholesterol metabolism, and the regulation of cellular free cholesterol concentration. *Fed Am Soc Exp Biol J.* 6:3162-3168.
- Fleet JC, 2000. Leptin and bone: does the brain control bone biology? *Nutr Rev.* 58:209-211.
- Forti N, Diament J, 2006. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. *Arq Bras Cardiol.* 87:614-622.

- Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, Lublin DM, Franklin V, Williams DL, Lisanti MP, 2002. Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry*. 41:11931-11940.
- Frank PG, Cheung MWC, Pavlides S, Llaverias G, Park DS, Lisanti MP, 2006. Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291:H677-H686.
- Franz-Odenaal T, Hall BK, Witten PE, 2006. Buried Alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dynamics*. 235:176-190.
- Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, Gabet Y, 2010. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J. Cell Physiol*. 224:305-310.
- Frost HM, 1960. *In vivo* osteocyte death. *J Bone Joint Surg Am*. 42:138-143.
- Galbiati F, Volonté D, Brown AM, Weinstein DE, Ben-Ze'ev A, Pestell RG, Lisanti MP, 2000. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/beta-catenin/Lef-1 signaling by recruiting beta-catenin to caveolae membrane domains. *J Biol Chem*. 275:23368-23377.
- Galbiati F, Volonté D, Liu J, Capozza F, Frank PG, Zhu L, Pestell RG, Lisanti MP, 2001. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via p53/p21(WAF/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Chem*. 276:2229-2244.
- Gao Q, Horvath TL, 2008. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 294:E817-26.
- Gillotte-Taylor K, Boullier A, Witztum JL, Steinberg D, Quehenberger O, 2001. Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 42:1474-1482.
- Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, Chen J, 2002. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol*. 283:F1-F10.
- Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE, 2002. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J. Cell Biochem*. 85:825-836.
- Gortazar AR, Martin-Millan M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T, 2013. Crosstalk between caveolin-1/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and β -catenin

- survival pathways in osteocyte mechanotransduction. *J Biol Chem.* 288:8168-8175.
- Goudriaan JR, den Boer MAM, Rensen PCN, Febbraio M, Kuipers F, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ, 2005. CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance. *J Lipid Res.* 46:2175-2181.
- Guan Y, Ackert-Bicknell CL, Kell B, Troyanskaya OG, Hibbs MA, 2010. Functional genomics complements quantitative genetics in identifying disease-gene associations. *PLoS Comput Biol.* 6:e1000991.
- Guerre-Millo M, 2004. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 30:13-19.
- Guo J, Liu M, Yang D, Bouxsein ML, Thomas CC, Schipani E, Bringhurst FR, Kronenberg HK, 2010. Phospholipase C signaling via the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is essential for normal bone responses to PTH. *Endocrinology.* 151:3502-3513.
- Gupta P, Bhatia V, 2008. Corticosteroid physiology and principles of therapy. *Indian J Pediatr.* 75:1039-1044.
- Hall WL, Jeanes YM, Lodge JK, 2005. Hyperlipidemic subjects have reduced uptake of newly absorbed vitamin E into their plasma lipoproteins, erythrocytes, platelets, and lymphocytes, as studied by deuterium-labeled α -tocopherol biokinetics. *J Nutr.* 135:58-63.
- Hamel P, Abed E, Brisette L, Moreau R, 2008. Characterization of oxidized low-density lipoprotein-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294:C1021-C1033.
- Hamrick MW, Pennington C, Newton D, Xie D, Isaacs C, 2004. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone.* 34:376-383.
- Heany RP, Weaver CM, 2005. Newer perspectives on calcium nutrition and bone quality. *J Am Coll Nutr.* 24:574S-581S.
- Hegele RA, 2009. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet.* 10:109-121.
- Hegsted DM, 2001. Fractures, calcium, and the modern diet. *Am J Clin Nutr.* 74:571-573.

- Hernández JL, Olmos JM, Ramos C, Martínez J, de Juan J, Valero C, Nan D, González-Macías J, 2010. Serum lipids and bone metabolism in Spanish men: the Camargo cohort study. *Endocr J.* 57:51-60.
- Higuchi K, Kitagawa K, Kogishi K, Takeda T, 1992. Developmental and age-related changes in apolipoprotein B mRNA editing in mice. *J Lipid Res.* 33:1753-1764.
- Hildebrand RB, Lammers B, Meurs I, Korporaal SJ, De Haan W, Zhao Y, Kruijt JK, Pratico D, Schimmel AW, Holleboom AG, Hoekstra M, Kuivenhoven JA, Van Berkel TJ, Rensen PC, van Eck M, 2010. Restoration of high-density lipoprotein levels by cholesteryl ester transfer protein expression in scavenger receptor class B type I (SR-BI) knockout mice does not normalize pathologies associated with SR-BI deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30:1439-1445.
- Hirano K, Yamashita S, Nakagawa Y, Ohya T, Matsuura F, Tsukamoto K, Okamoto Y, Matsuyama A, Matsumoto K, Miyagawa J, Matsuzawa Y, 1999. Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 85:108-116.
- Hockerstedt A, Tikkanen MJ, Jauhiainen M, 2002. LCAT facilitates transacylation of 17 beta-estradiol in the presence of HDL3 subfraction. *J Lipid Res.* 43:392-397.
- Hoekstra M, Meurs I, Koenders M, Out R, Hildebrand RB, Kruijt JK, van Eck M, Van Berkel TJ, 2008. Absence of HDL cholesteryl ester uptake in mice via SR-BI impairs an adequate adrenal glucocorticoid-mediated stress response to fasting. *J. Lipid Res.* 49:738-745.
- Hoekstra M, Ye D, Hildebrand RB, Zhao Y, Lammers B, Stitzinger M, Kuiper J, Van Berkel TJC, Van Eck M, 2009. Scavenger receptor class B type I-mediated uptake of serum cholesterol is essential for optimal adrenal glucocorticoid production. *J Lipid Res.* 50:1039-1046.
- Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M, 2010. Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol.* 16:5916-5924.
- Hoekstra M, Van der Sluis RJ, Van Eck M, Van Berkel TJC, 2013. Adrenal-specific scavenger receptor BI deficiency induces glucocorticoid insufficiency and lowers plasma very-low-density and low-density lipoprotein levels in mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 33:e39-46.
- Hoofnagle AN, Heinecke JW, 2009. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res.* 50:1967-1975.

- Hu Q, Zhang XJ, Liu CX, Wang XP, Zhang Y, 2010. PPAR γ 1-induced caveolin-1 enhances cholesterol efflux and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Res.* 47:69–79.
- Huang QY, Kung AW, 2006. Genetics of osteoporosis. *Mol. Genet. Metab.* 88:295–306.
- Huby T, Doucet C, Dachet C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, Rubin E, Chapman MJ, Lesnik P, 2006. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest.* 116:2767–2776.
- Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G, 2006. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol.* 41:48–72.
- Hulit J, Bash T, Fu M, Galbiati F, Albanese C, Sage DR, Schlegel A, Zhurinsky J, Shtutman M, Ben Ze'ev A, Lisanti MP, Pestell RG, 2000. The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1. *J Biol Chem.* 275:21203–21209.
- Hussain MM, Maxfield MR, Mas-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, Mahley RW, 1991. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem.* 266:13936–13940.
- Ikonen E, 2006. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev.* 86:1237–1261.
- Irshad M, Dubey R, 2005. Apolipoproteins and their role in different clinical conditions: an overview. *Indian J Biochem Biophys.* 42:73–80.
- Isales CM, Zaidi M, Blair HC, 2010. ACTH is a novel regulator of bone mass. *Ann NY Acad Sci.* 1192:110–116.
- Isenberg JS, Jia Y, Fukuyama J, Switzer CH, Wink DA, Roberts DD, 2007. Thrombospondin-1 inhibits nitric oxide signaling via CD36 by inhibiting myristic acid uptake. *J Biol Chem.* 282:15404–15415.
- Ishigami M, Swertfeger DK, Hui MS, Granholm NA, Hui DY, 2000. Apolipoprotein E inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation but not the inhibition of migration is mediated through activation of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1020–1026.
- Ivaska KK, Lenora J, Gerdhem P, Åkesson K, Väänänen HK, Obrant KJ, 2008. Serial assessment of serum bone metabolism markers identifies women with the highest rate of bone loss and osteoporosis risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:2622–2632.

- Janssens K, Van Hul W, 2002. Molecular genetics of too much bone. *Hum Mol Genet.* 11:2385-2393.
- Jasmin J, Yang M, Iacovitti L, Lisanti MP, 2009. Genetic ablation of caveolin-1 increases neural stem cell proliferation in the subventricular zone (SVZ) of the adult mouse brain. *Cell Cycle.* 8:3978-3983.
- Jensky NE, Hyder J, Allison M, Wong N, Aboyans V, Blumenthal RS, Schreiner P, Carr JJ, Wassel CL, Ix JH, Criqui MH, 2011. The association of bone density and calcified atherosclerosis is stronger in women without dyslipidemia: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Bone Miner Res.* 26:2702-2709.
- Jernas M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, Levin M, Sjögren A, Rudemo M, Lystig TC, Carlsson B, Carlsson LM, Lonn M, 2006. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *Fed Am Soc Exp Biol J.* 20:1540-1542.
- Ji A, Meyer JM, Cai L, Akinmusire A, De Beer MC, Webb NR, Van der Westhuyzen DR, 2011. Scavenger receptor SR-BI in macrophage lipid metabolism. *Atherosclerosis.* 217:106-112.
- Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J, 2006. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res.* 99:1044-1059.
- Joiner DM, Tayim RJ, McElderry JD, Morris MD, Goldstein SA, 2014. Aged male rats regenerate cortical bone with reduced osteocyte density and reduced secretion of nitric oxide after mechanical stimulation. *Calc Tissue Int.* 94:484-494.
- Kadowaki T, Yamauchi T, 2011. Adiponectin receptor signaling: a new layer to the current model. *Cell Metab.* 13:123-134.
- Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JH, Krueger W, Maye P, Yu F, Zhao Y, Kuo L, Gupta RR, Achenie LE, Wang HW, Shin DG, Rowe DW, 2005. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem.* 280:24618-24626.
- Kalyvioti E, Papachristou N, Triantaphyllidou IE, Karavia E, Plakoula E, Blair H, Kypreos K, Papachristou D, 2013. Apolipoprotein A-I deficiency is associated with decreased expression of osteoblast-specific regulators in mice. *Bone Abstracts* 1:PP354.
- Kanatani N, Fujita T, Fukuyama R, Liu W, Yoshida CA, Moriishi T, Yamana K, Miyazaki T, Toyosawa S, Komori T, 2006. Cbfa1 beta regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. *Dev Biol.* 296:48-61.

- Kaplan ZS, Jackson SP, 2010. SR-BI and fatty platelets. *Blood*. 116:1827-1838.
- Kapur NK, Ashen D, Blumenthal RS, 2008. High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 4:39057
- Karsenty G, Noda M, 2005. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *J Biol Chem*. 280:30192-30200.
- Kathuria H1, Cao YX, Ramirez MI, Williams MC, 2004. Transcription of the caveolin-1 gene is differentially regulated in lung type I epithelial and endothelial cell lines. A role for ETS proteins in epithelial cell expression. *J Biol Chem*. 279:30028-30036.
- Katz S, Weinerman S, 2010. Osteoporosis and Gastrointestinal Disease. *Japan J Gastroenterol*. 6:506-517.
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ, 2008. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Rev*. 29:155-192.
- Keller H, Kneissel M, 2005. *SOST* is a target gene for PTH in bone. *Bone*. 37:148-158.
- Kevorkova O, Martineau C, Martin-Falstrault L, Sanchez-Dardon J, Brissette L, Moreau R, 2013. Low-bone-mass phenotype of deficient mice for the cluster of differentiation 36 (CD36). *PLoS One*. 8: e77701.
- Khanal T, Kim HG, Do MT, Choi JH, Won SS, Kang W, Chung YC, Jeong TC, Jeong HG, 2014. Leptin induces CYP1B1 expression in MCF-7 cells through ligand-independent activation of the ER α pathway. *Tox Appl Pharmacol*. 277:39-48.
- Kibbey RG, Rizo J, Gierasch LM, Anderson RGW, 1998. The LDL receptor clustering motif interacts with the clathrin terminal domain in a reverse turn conformation. *J Cell Biol*. 142:59-67.
- Kim DH, Inagaki Y, Suzuki T, Ioka RX, Yoshioka SZ, Magoori K, Kang MJ, Cho Y, Nakano AZ, Liu Q, Fujino T, Suzuki H, Sasano H, Yamamoto TT, 1998. A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E. *J Biochem*. 124:1072-1076.

- Kim HP, Wang X, Nakao A, Kim SI, Murase N, Choi ME, Ryter SW, Choi AM, 2005. Caveolin-1 expression by means of p38beta mitogen-activated protein kinase mediates the antiproliferative effect of carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:11319-11324.
- Klein EA, Assoian RK, 2008. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci*. 121:3853-3857.
- Knopp RH, Paramsothy P, Retzlaff BM, Fish B, Walden C, Dowdy A, Tsunehara C, Aikawa K, Cheung MC, 2005. Gender differences in lipoprotein metabolism and dietary response: basis in hormonal differences and implications for cardiovascular disease. *Curr Atheroscl Rep*. 7:472-479.
- Komori T, 2003. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab*. 21:193-197.
- Komori T, 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 99:1233-1239.
- Komori T, 2013. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res*. 352:191-198.
- Koonen DPY, Febbraio M, Bonnet S, Nagendran J, Young ME, Michelakis ED, Dyck JRB, 2007. CD36 Expression Contributes to Age-Induced Cardiomyopathy in Mice. *Circulation*. 116:2139-2147.
- Korporaal SJ, Relou IA, van Eck M, Strasser V, Bezemer M, Gorter G, van Berkel TJ, Nimpf J, Akkerman JW, Lenting PJ, 2004. Binding of low density lipoprotein to platelet apolipoprotein E receptor 2' results in phosphorylation of p38MAPK. *J Biol Chem*. 279:25526-25534.
- Kothapalli D, Fuki I, Ali K, Stewart SA, Zhao L, Yahil R, Kwiatkowski D, Hawthorne EA, FitzGerald GA, Phillips MC, Lund-Katz S, Pure E, Rader DJ, Assoian RK, 2004. Antimitogenic effects of HDL and APOE mediated by Cox-2-dependent IP activation. *J Clin Invest*. 113:609-618.
- Kousteni S, Chen JR, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, Plotkin L, Fu Q, Mancino AT, Wen Y, Vertino AM, Powers CC, Stewart SA, Ebert R, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC, 2002. Reversal of Bone Loss in Mice by Nongenotropic Signaling of Sex Steroids. *Science*. 298:843-846.
- Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL, 1990. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. 265:10771-10775.

- Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M, 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. 387:414-417.
- Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M, 2010. Osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol*. 30:3071-3085.
- Krieger M, 2001. Multiligand receptors Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest*. 108:793-797.
- Krimbou L1, Denis M, Haidar B, Carrier M, Marcil M, Genest J Jr, 2004. Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation. *J lipid res* 45:839-848.
- Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA, 2006. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. 116:1202-1209.
- Krum SA, 2011. Direct transcriptional targets of sex steroid hormones in bone. *J Cell Biochem*. 112:401-408.
- Kubota T, Michigami T, Ozono K, 2009. Wnt signaling in bone metabolism *J Bone Miner Metab*. 27:265-271.
- Kulie T, Groff A, Redmer J, Hounshell J, Schrager S, 2009. Vitamin D: an evidence-based review. *J Am Board Fam Med*. 22:698-706.
- Kwiterovich PO Jr, 2000. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol*. 86:5L-10L.
- Laatsch A, Panteli M, Sornsakrin M, Hoffzimmer B, Grewal T, Heeren J, 2012. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E. *PLoS One*. 7:e29385.
- Lampasso JD, Marzec N, Margarone J 3rd, Dziak R, 2002. Role of protein kinase C alpha in primary human osteoblast proliferation. *J Bone Miner Res*. 17:1968-1976.
- Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH, 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest*. 98:984-995.
- Langer T, Strober W, Levy RI, 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest*. 51:1528-1536.

- Lannigan DA, 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*. 68:1-9.
- Leidig-Bruckner G, Ziegler R, 2001. Diabetes mellitus a risk for osteoporosis? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 109:S493-S514.
- Le Lay S, Li Q, Proschogo N, Rodriguez M, Gunaratnam K, Cartland S, Rentero C, Jessup W, Mitchell T, Gaus K, 2009. Caveolin-1-dependent and -independent membrane domains. *J Lipid Res*. 50:1609-1620.
- Lenora J, Ivaska KK, Gerdhem P, 2009. Use of bone turnover markers in osteoporosis. *Clinic Rev Bone Miner Metab*. doi 10.1007/s12018-009-9042-x.
- Lerner UH, 2004. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 15:64-81.
- Lerner UH. 2006. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 85:584-595.
- Levesque M, Martineau C, Jumarie C, Moreau R, 2008. Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human osteoblast-like MG-63 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 231:308-317.
- Levy E, Spahis S, Sinnett D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M, Lavoie MA, 2007. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol*. 18:310-318.
- Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D, 2005. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 280:19883-19887.
- Li H, Weinstein IB, 2006. Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 66:11399-11408.
- Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, BDaugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C, 2008. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res*. 23:860-869.
- Li XF, Yan J, Jiang LS, Dai LY, 2011. Age-related variations of leptin receptor expression in the growth plate of spine and limb: gender- and region-specific changes. *Histochem Cell Biol*. 135:487-497.

- Liao JK, Laufs U, 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:89-118.
- Liu J, Voutilainen R, Heikkilä P, Kahri AI, 1997. Ribonucleic acid expression of the CLA-1 gene, a human homolog to mouse high density lipoprotein receptor SR-BI, in human adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2522-2527.
- Liu P, Rudick M, Anderson RGW, 2002. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem.* 277:41295-41298.
- Liu Y, Song CY, Wu SS, Liang QH, Yuan LQ, Liao EY, 2013a. Novel adipokines and bone metabolism. *Int J Endocrinol.* doi.org/10.1155/2013/895045.
- Liu J, Zhu LP, Yang XL, Huang HL, Ye DQ, 2013b. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and bone mineral density: a meta-analysis. *Bone.* 54:151-156.
- Liu E, Samas F, Mueller BM, 2013c. Local adipocytes enable estrogen-dependent breast cancer growth: role of leptin and aromatase. *Adipocytes.* 2:165-169.
- Ljusberg J, Wang Y, Lång P, Norgård M, Dodds R, Hultenby K, Ek-Rylander B, Andersson G, 2005. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J Biol Chem.* 280:28370-28381.
- Llorente-Cortes V, Royo T, Otero-Vinas M, Berrozpe M, Badimon L, 2002. Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Circ.* 106:3104-3110.
- Lopez D, McLean MP, 2006. Estrogen regulation of the scavenger receptor class B gene: Anti-atherogenic or steroidogenic, is there a priority? *Mol Cell Endocrinol.* 247:22-33.
- Lorenz JN, Loreaux EL, Dostanic-Larson I, Lasko V, Schnetzer JR, Paul RJ, Lingrel JB, 2008. ACTH-induced hypertension is dependent on the ouabain-binding site of the $\alpha 2$ -Na⁺-K⁺-ATPase subunit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295:H273-280.
- Lougheed M, Steinbrecher UP, 1996. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J Biol Chem.* 271:11798-11805.

- Lu ML, Schneider MC, Zheng Y, Zhang X, Richie JP, 2001. Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. *J Biol Chem.* 276:13442-13451.
- Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T, 2003. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell.* 4:499-515.
- Lundasen T, Liao W, Angelin B, Rudling M, 2003. Leptin induces the hepatic high density lipoprotein receptor scavenger receptor B type I (SR-BI) but not cholesterol 7alpha-hydroxylase (Cyp7a1) in leptin-deficient (ob/ob) mice. *J Biol Chem.* 278:43224-43228.
- Ma Y, Wang W, Zhang J, Lu Y, Wu W, Yan H, Wang Y, 2012. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in Ldlr-deficient mice on a long-term high-fat diet. *Plos One* 7:e35835.
- Maeda S, Nakanishi S, Yoneda M, Awaya T, Yamane K, Hirano T, Kohno N, 2012. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and risk of atherosclerosis in Japanese-Americans. *J Atheroscler Thromb.* 19:444-452.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH, 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 25:1277-1294.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Hussain MM, Greenman B, Fisher M, Vogel T, Gorecki M, 1989. Intravenous infusion of apolipoprotein E accelerates clearance of plasma lipoproteins in rabbits. *J Clin Invest.* 83:2125-2130.
- Malerød L, Sporstøl M, Juvet LK, Mousavi SA, Gjøen T, Berg T, Roos N, Eskild W, 2005. Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 336:1096-1105.
- Mancini L, Paul-Clark MJ, Rosignoli G, Hannon R, Martin JE, Macintyre I, Perretti M, 2007. Calcitonin and prednisolone display antagonistic actions on bone and have synergistic effects in experimental arthritis. *Am J Pathol.* 170:1018-1027.
- Manolagas SC, 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 21:115-137.
- Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, Quinones V, Amigo L, Rozowski J, Krieger M, Rigotti A, 2002. Alpha-tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. *J Nutr.* 132:443-449.

- Martin KJ, Gonzalez EA, 2007. Metabolic Bone Disease in Chronic Kidney Disease J Am Soc Nephrol. 18:875–885.
- Martin SS, Qasim A, Reilly MP, 2008. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. J Am Coll Cardiol. 52:1201-1210.
- Martineau C, Martin-Falstraalt L, Brisette L, Moreau R, 2014a. The atherogenic *Scarb1* null mouse model shows a high bone mass phenotype. Am J Physiol-Endocrinol Metab. 306:E48-E57.
- Martineau C, Martin-Falstraalt L, Brisette L, Moreau R, 2014b. Gender- and region-specific alterations of bone metabolism in *Scarb1*-null female mice. J Endocrinol. 222:277-288.
- Martineau C, Kevorkova O, Brisette L, Moreau R, 2014c. Scavenger receptor class B, type I (*Scarb1*) deficiency promotes osteoblastogenesis but stunts terminal osteocyte differentiation. Phys Rep. 2:e12117.
- Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, Rolland C, Cabezón E, Champagne E, Pineau T, Georgeaud V, Walker JE, Tercé F, Collet X, Perret B, Barbaras R, 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. Nature. 421:75-79.
- Mattsson C, Olsson T, 2007. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. Curr Med Chem. 14:2918-2924.
- Maxfield FR, Wüstner D, 2012. Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. Methods Cell Biol. 108:367-393.
- McFarlane AS, 1958. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. Nature. 182:53.
- Meeran SM, Katiyar SK, 2008. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. Front Biosci. 13:2191-2202.
- Meir KS, Leitersdorf E, 2004. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. Arterioscl Thromb Vasc Biol. 24:1006–1014.
- Miettinen HE, Rayburn H, Krieger M, 2001. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice. J Clin Invest. 108:1717–1722.

- Mineo C, Shaul PW, 2012. Functions of scavenger receptor class B, type I in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 23:487-493.
- Mitchell BD, Yerges-Armstrong LM, 2011. The genetics of bone loss: challenges and prospects. *J Clin Endocrinol Metab.* 96:1258-1268.
- Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV, 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Disc.* 11:937-957.
- Mohan S, Richman C, Guo R, Amaar Y, Donahue LR, Wergedal J, Baylink DJ, 2003. Insulin-like growth factor regulates peak bone mineral density in mice by both growth hormone-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology.* 144:929-936.
- Moore KJ, Freeman MW, 2006. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1702-1711.
- Moreau R, Aubin R, Lapointe JY, Lajeunesse D, 1997. Pharmacological and biochemical evidence for the regulation of osteocalcin secretion by potassium channels in human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res.* 12:1984-1992.
- Moriarty K, Kim KH, Bender JR, 2006. Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signalling. *Endocrinology.* 147:5557-5563.
- Motyl KJ, Rosen CJ, 2012. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie.* 94:2089-2096.
- Murray AJ, 2008. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Cell Signaling.* 1(22):re4.
- Nagajyothi F, Desruisseaux M, Bouzahzah B, Weiss LM, Andrade DS, Factor SM, Scherer PE, Albanese C, Lisanti MP, Tanowitz HB, 2006. Cyclin and caveolin expression in an acute model of murine Chagasic myocarditis. *Cell Cycle.* 5:107-112.
- Nagy A, 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Neumann S, Coudreuse DYM, van der Westhuyzen DR, Eckhardt ERM, Korswagen HC, Schmitz G, Sprong H, 2009. Mammalian Wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic.* 10:334-343.
- Nichols B, 2003. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci.* 116:4707-4714.

- Niemeier A, Kassem M, Toedter K, Wendt D, Ruether W, Beisiegel U, Heeren J, 2005. Expression of LRP1 by human osteoblasts: A mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J Bone Miner Res.* 20:283–293.
- Niemeier A, Goetz A, Rukiye S, Qiu W, Ruether W, Heeren J, 2010. Apolipoprotein E inhibits osteoblast differentiation and function by suppression of canonical wnt/ β -catenin signaling. *Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU)*. doi: 10.3205/10dkou135, meeting abstract.
- Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furakawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T, 2004. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the β -catenin/TCF pathway. *Oncogene.* 23:8520-8526.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA, 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81:1535-1565.
- Noël L, Guerin T, Kolf-Clauw M, 2004. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food Chem Toxicol.* 42:1203-1210.
- Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C, 2005. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Q J Med.* 98:845–856.
- O'Neill TW, 2005. Looking back: developments in our understanding of the occurrence, aetiology and prognosis of osteoporosis over the last 50 years. *Rheumatol Oxford Engl.* 44:iv33–iv35.
- Orozco P, 2004. Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal overweight women. *Eur J Epidemiol.* 19:1105-1112.
- Osgood D, Corella D, Demissie S, L. Cupples LA, Wilson PWF, Meigs JB, Schaefer EJ, Coltell O, Ordovas JM, 2003. Genetic variation at the scavenger receptor class B type I gene locus determines plasma lipoprotein concentrations and particle size and interacts with type 2 diabetes: The Framingham Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:2869–2879.
- Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A, 2014. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2:411-429
- Out R, Krujit JK, Rensen PCN, Hildebrand RB, de Vos P, van Eck M, van Berkel TJC, 2004. Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism. *J Biol Chem.* 279:18401-18406.

- Pan B, Ma Y, Ren H, He Y, Wang Y, Lv X, Liu D, Ji L, Yu B, Wang Y, Chen YE, Pennathur S, Smith JD, Liu G, Zheng L, 2012. Diabetic HDL is dysfunctional in stimulating endothelial cell migration and proliferation due to down regulation of SR-BI expression. *Plos one*. 7:e48530.
- Parfitt AM, 2001. The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res*. 16:1583-1585.
- Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M, Demer LL, 1999. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 14:2067-2078.
- Parhami F, Garfinkel A, Demer LL, 2000, Role of lipids in osteoporosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 20:2346-2348.
- Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL, 2001. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res*. 16:182-188.
- Parhami F, Basseri B, Hwang J, Tintut Y, Demer LL, 2002. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ Res*. 91:570-576.
- Parton RG, Hanzal-Bayer M, Hancock JF, 2006. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci*. 119:787-796.
- Pérez-López FR, Chedraui P, Cuadros-López JL, 2010. Bone mass gain during puberty and adolescence: deconstructing gender characteristics. *Curr Med Chem*. 17:453-466.
- Pérez-Martínez P, Ordovás JM, López-Miranda J, Gómez P, Marín C, Moreno J, Fuentes F, Fernández de la Puebla RA, Pérez-Jiménez F, 2003. Polymorphism exon 1 variant at the locus of the scavenger receptor class B type I gene: influence on plasma LDL cholesterol in healthy subjects during the consumption of diets with different fat contents. *Am J Clin Nutr*. 77:809-813.
- Pike LJ, 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*. 44:655-667.
- Pilch PF, Souto RP, Liu L, Jedrychowski MP, Berg EA, Costello CE, Gygi SP, 2007. Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae. *J Lipid Res*. 48:2103-2111.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL, 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in

- apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 71:343-353.
- Poli A, Bruschi F, Cesana B, Rossi M, Paoletti R, Crosignani PG, 2003. Plasma low-density lipoprotein cholesterol and bone mass densitometry in postmenopausal women. *Obst Gynecol*. 102:922-926.
- Quest AFG, Gutierrez-Pajares JL, Torres VA, 2008. Caveolin-1: an ambiguous partner in cell signalling and cancer. *J Cell Mol Med*. 12:1130-1150.
- Raisz LG, 1999. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*. 48B:1353-1358.
- Raisz LG, 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 115:3318-3325.
- Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R, Ostermay S, Schinke T, Spanbroek R, Zaiss MM, Angel PE, Lerner UH, David JP, Reichardt HM, Amling M, Schütz G, Tuckermann JP, 2010. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab*. 11:517-531.
- Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP, 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*. 276:38121-38138.
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP, 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev*. 54:431-467.
- Resh MD, 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biophys Biochem Act*. 1451:1-16.
- Reyes García R, Rozas Moreno P, Muñoz-Torres M, 2011. Osteocalcin and atherosclerosis: a complex relationship. *Diabetes Res Clin Pract*. 92:405-416.
- Rhinds D, Brodeur RM, Lapointe J, Charpentier D, Falstraalt L, Brissette L, 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochem* 42:7527-7538.

- Rhainds D, Bourgeois P, Bourret G, Huard K, Falstraalt L, Brissette L, 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Science*. 117:3095-3105.
- Rhainds D, Brissette L, 2004. The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking: defining the rules for lipid traders. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:39-77.
- Riddell DR, Vinogradov DV, Stannard AK, Chadwick N, Owen JS, 1999. Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J Lipid Res*. 40:1925-1930.
- Riddell DR, Sun XM, Stannard AK, Soutar AK, Owen JS, 2001. Localization of apolipoprotein E receptor 2 to caveolae in the plasma membrane. *J Lipid Res*. 42:998-1002.
- Riddle RC, Diegel CR, Leslie JM, van Koeveering KK, Faugere MC, Clemens TL, Williams BO, 2013. Lrp5 and Lrp6 exert overlapping functions in osteoblast during postnatal bone acquisition. *Plos One*. 8:e63323.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 2002. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine Rev*. 23:279-302.
- Rigotti A, Edelman ER, Seifert P, Iqbal SN, DeMattos RB, Temel RE, Krieger M, Williams DL, 1996. Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the *in vivo* expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J Biol Chem*. 271:33545-33549.
- Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M, 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Nat Acad Sci*. 94:12610-12615.
- Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M, 2003. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr. Rev*. 24:357-387.
- Rinninger F, Wang N, Ramakrishnan R, Jiang XC, Tall AR, 1999. Probucol enhances selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters *in vitro* by a scavenger receptor B-I-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:1325-1332.

- Rizzoli R, Bonjour JP, Ferrari SL, 2001. Osteoporosis, genetics and hormones. *J Mol Endocrinol.* 26:79-94.
- Roberts DC, Miller NE, Price SG, Crook D, Cortese C, La Ville A, Masana L, Lewis B, 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins *in vitro*. *Biochem J.* 226:319-322.
- Rodrigueza WV, Thuahnai ST, Temel RE, Lund-Katz S, Phillips MC, Williams DL, 1999. Mechanism of scavenger receptor class B type I-mediated selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoprotein to adrenal cells. *J Biol Chem.* 274:20344-20350.
- Rubin J, Schwartz Z, Boyan BD, Fan X, Case N, Sen B, Drab M, Smith D, Aleman M, Wong KL, Yao H, Jo H, Gross TS, 2007. Caveolin-1 Knockout Mice Have Increased Bone Size and Stiffness. *J Bone Miner Res.* 22:1408–1418.
- Ruhl CE, Everhart JE, 2002. Relationship of serum leptin concentration with bone mineral density in the United States population. *J Bone Miner Res.* 17:1896-1903.
- Saddar S, Carriere V, Lee WR, Tanigaki K, Yuhanna IS, Parathath S, Morel E, Warriar M, Sawyer JK, Gerard RD, Temel RE, Brown JM, Connelly M, Mineo C, Shaul PW, 2013. Scavenger receptor class B type I is a plasma membrane cholesterol sensor. *Circ Res.* 112:140–151.
- Sanders KM, Nicholson GC, Ugoni M, Seeman E, Pasco J, Kotowicz M, 2002. Fracture rates lower in rural than urban communities: the Geelong Osteoporosis Study. *J Epidemiol Commun Health.* 56:466–470.
- Sandhu SK, Hampson G, 2011. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. *J Clin Pathol.* 64:1042–1050.
- Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z, 2004. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1750-1754.
- Schilling AF, Schinke T, Münch C, Gebauer M, Niemeier A, Priemel M, Streichert T, Rueger JM, Amling M, 2005. Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J Bone Miner Res.* 20:274–282.
- Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP, 1999. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling: caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ER α . *J Biol Chem.* 274:33551-33556.

- Schwencke C, Braun-Dullaeus RC, Wunderlich C, Strasser RH, 2006. Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: implications for human disease. *Cardiovasc Res.* 70:42-49.
- Sekine Y, Demosky SJ, Stonik JA, Furuya Y, Koike H, Suzuki K, Remaley AT, 2010. High-density lipoprotein induces proliferation and migration of human prostate androgen-independent cancer cells by an ABCA1-dependent mechanism. *Mol Cancer Res* 8:1284-1294.
- Shashkin P, Dragulev B, Ley K, 2005. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des.* 11:3061-3072.
- Shen GX, 2003. Selective protein kinase C inhibitors and their applications. *Curr Drug Targets-Cardiovasc Hematol Dis.* 3:301-307.
- Shutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben Ze'ev A, 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:5522-5527.
- Si J, Ge Y, Zhuang S, Wang LJ, Chen S, Gong R, 2013. Adrenocorticotrophic hormone ameliorates acute kidney injury by steroidogenic-dependent and - independent mechanisms. *Kidney Int.* 83:635-646.
- Sich D, Saïdi Y, Giral P, Lagrost L, Egloff M, Auer C, Gautier V, Turpin G, Beucler I, 1998. Hyperalphalipoproteinemia: characterization of a cardioprotective profile associating increased high-density lipoprotein2 levels and decreased hepatic lipase activity. *Metabolism.* 47:965-973.
- Silver DL, Jiang XC, Tall AR, 1999. Increased high density lipoprotein (HDL), defective hepatic catabolism of ApoA-I and ApoA-II, and decreased ApoA-I mRNA in ob/ob mice. Possible role of leptin in stimulation of HDL turnover. *J Biol Chem.* 274:4140-4146.
- Silver DL, Wang N, Tall AR, 2000. Defective HDL particle uptake in ob/ob hepatocytes causes decreased recycling, degradation, and selective lipid uptake. *J Clin Invest.* 105:151-159.
- Silverstein RL, Febbraio M, 2009. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science Sign.* 2:re3.1-8.
- Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M, 1999. Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-related cancer* 6:131-137.

- Simpson ER, 2003. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86:225-230.
- Singer FR, Eyre DR, 2008. Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Clev Clin J Med.* 75:739-750.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP, 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 19:7289-7304.
- Somara S, Gilmont RR, Martens JR, Bitar KN, 2007. Ectopic expression of caveolin-1 restores physiological contractile response of aged colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293:G240-G249.
- Song WJ, Schreiber WE, Zhong E, Liu FF, Kornfeld BD, Wondisford FE, Hussain MA, 2008. Exendin-4 stimulation of cyclin A2 in beta-cell proliferation. *Diabetes.* 57:2371-2381.
- Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J, Fagard R, 1999. Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group. *Lancet.* 353:1140-1144.
- Stagi S, Cavalli L, Iurato C, Seminara S, Brandi ML, de Martino M, 2013. Bone metabolism in children and adolescents: main characteristics of the determinants of peak bone mass. *Clin Cas Miner Bone Metab.* 10:172-179.
- Steinberg D, 1996. A docking receptor for HDL cholesterol esters. *Science.* 271:460-461.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M, 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 33:919-926.
- Stojanovic OI, Lazovic M, Lazovic M, Vuceljic M, 2011. Association between atherosclerosis and osteoporosis, the role of vitamin D. *Arch Med Sci.* 7:179-188.
- Sun Y, Wang N, Tall AR, 1999. Regulation of adrenal scavenger receptor-BI expression by ACTH and cellular cholesterol pools. *J Lipid Res.* 40:1799-1805.
- Sun B, Boyanovsky BB, Connelly MA, Shridas P, van der Westhuyzen DR, Webb NR, 2007. Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J Lipid Res.* 48:2560-2570.

- Sweet MG, Sweet JM, Jeremiah MP, Galazka SS, 2009. Diagnosis and treatment of osteoporosis. *Am Fam Physician*. 79:193-200.
- Taichman RS, 2005. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 105:2631-2639.
- Takada I, Kouzmenko AP, Kato S, 2009. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 5:442-447.
- Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Yamamoto TT, 2004. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J. Atheroscler. Thromb*. 11 (4): 200-8.
- Tan JT, Prosser HC, Vanags LZ, Monger SA, Ng MK, Bursill CA, 2014. High-density lipoproteins augment hypoxia-induced angiogenesis via regulation of post-translational modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Fed Am Soc Exp Biol J*. 28:206-1017.
- Tauchmanova L, Rossi R, Nuzzo V, del Puente A, Esposito-del Puente A, Pizzi C, Fonderico F, Lupoli G, Lombardi G, 2001. Bone loss determined by quantitative ultrasonometry correlates inversely with disease activity in patients with endogenous glucocorticoid excess due to adrenal mass. *Eur J Endocrinol*. 145:241-247.
- Tartaglia LA, 1997. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 272:6093-6096.
- Teitelbaum SL, 2006. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther*. 8:201.
- Terpos E, Asli B, Christoulas D, Brouet JC, Kastiris E, Rybojad M, Bengoufa D, Dimopoulos MA, Femand JP, 2012. Increased angiogenesis and enhanced bone formation in patients with IgM monoclonal gammopathy and urticarial skin rash: new insight into the biology of Schnitzler syndrome. *Haematologica*. 97:1699-1703.
- Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJC, 2000. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:1860-1872.

- Thomas T, Burguera B, Melton LJ, III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, Khosla S, 2001. Role of serum leptin, insulin, and estrogen levels as potential mediators of the relationship between fat mass and bone mineral density in men versus women. *Bone*. 29:114-120.
- Tokuda E, Seino Y, Arakawa A, Saito M, Kasumi F, Hayashi S, Yamaguchi Y, 2012. Estrogen receptor- α directly regulates sensitivity to paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 133:427-436.
- Tondu AL, Robichon C, Yvan-Charvet L, Donne N, Le L, X, Hajduch E, Ferre P, Dugail I, Dagher G, 2005. Insulin and angiotensin II induce the translocation of scavenger receptor class B, type I from intracellular sites to the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem*. 280:33536-33540.
- Torres VA, Tapia JC, Rodriguez DA, Lladser A, Arredondo C, Leyton L, Quest AFG, 2007. E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced β -catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol Cell Biol*. 27:7703-7717.
- Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A, 2003. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 23:1732-1738.
- Trigatti B, Covey S, Rizvi A, 2004. Scavenger receptor class B type I in high density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. *Biochem Soc Trans*. 32:116-120.
- Truong TQ, Aubin D, Bourgeois P, Falstraalt L, Brissette L, 2006. Opposite effect of caveolin-1 in the metabolism of high-density and low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1761:24-36.
- Truong TQ, Aubin D, Falstraalt L, Brodeur MR, Brissette L, 2010. SR-BI, CD36, and caveolin-1 contribute positively to cholesterol efflux in hepatic cells. *Cell Biochem Funct*. 28:480-489.
- Tu X, Rhee Y, Condon KW, Bivi N, Allen MR, Dwyer D, Stolina M, Turner CH, Robling AG, Plotkin LI, Bellido T, 2012. *Sost* downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone*. 50:209-217.
- Turner RT, Kalra SP, Wong CP, Philbrick KA, Lindenmaier LB, Boghossian S, Iwaniec UT, 2013. Peripheral leptin regulates bone formation. *J Bone Miner Res*. 28:22-34.

- Uyama O, Yoshimoto Y, Yamamoto Y, Kawai A, 1997. Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke*. 28:1730-1732.
- Väänänen HK, Laitala-Leinonen T, 2008. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys*. 473:132-138.
- Väänänen HK, Zhao H, 2008. Osteoclast function: biology and mechanism. In *Principles of bone biology*. 3rd edition. American Press. Chapter 10;191-207.
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C, 2004. Androgens and bone. *Endocrine Rev*. 25:389-425.
- Vanderschueren D, Venken K, Ophoff J, Bouillon R, Boonen S, 2006. Clinical review: sex steroids and the periosteum – reconsidering the roles of androgens and estrogens in periosteal expansion. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:378-382.
- van der Velde AE, Groen AK, 2004. Shifting gears: liver SR-BI drives reverse cholesterol transport in macrophages. *J Clin Invest*. 115:2699-2701.
- van Lierop AH, Moester MJ, Hamdy NA, Papapoulos SE, 2014. Serum Dickkopf 1 levels in sclerostin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 99:E252-E256.
- Vassiliou G, Benoist F, Lau P, Kavaslar GN, McPherson R, 2001. The low density lipoprotein receptor-related protein contributes to selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by SW872 liposarcoma cells and primary human adipocytes. *J Biol Chem*. 276:48823-48830.
- Verroust PJ, Kozyraki R, 2003. Cubiline: role physiopathologique et relations avec la mégaline. *Méd Sci*. 19:337-343.
- Vihanto MM, Vindis C, Djonov V, Cerretti DP, Huynh-Do U, 2006. Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase. *J Cell Sci*. 119:2299-2309.
- Vihma V, Tikkanen MJ, 2011. Fatty acid esters of steroids: synthesis and metabolism in lipoproteins and adipose tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 124:65-76.
- von der RP, Hansen MA, Hassager C, 1999. The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med*. 106:273-278.
- Wang L, Wang YD, Wang WJ, Zhu Y, Li DJ, 2007a. Dehydroepiandrosterone improves murine osteoblast growth and bone tissue morphometry via mitogen-activated protein kinase signaling pathway independent of either androgen receptor or estrogen receptor. *J Mol Endocrinol*. 38:467-479.

- Wang X, Rundle CH, Wergedal JE, Srivastava AK, Mohan S, Lau KH, 2007b. Loss of sex-specific difference in femoral bone parameters in male leptin knockout mice. *Calc Tiss Int.* 80:374-382.
- Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J, 2001. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Nat Acad Sci.* 98:6871-6876.
- Weiss LA, Abney M, Cook EH, Jr, Ober C, 2006. Sex-specific genetic architecture of whole blood serotonin levels. *Am J Hum Genet.* 76:33-41.
- Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM, 2004. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene.* 341:19-39.
- Weston JM, Norris EV, Clark EM, 2011. The invisible disease: making sense of an osteoporosis diagnosis in older age. *Qual Health Res.* 21:1692-704.
- Willnow TE, Nykjaer A, Herzet J, 1999. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nature Cell Biol.* 1:E157-E162.
- Willnow TE, Hammes A, Eaton S, 2007. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development.* 134:3239-3249.
- Windahl SH, Lagerquist MK, Andersson N, Jochems C, Kallkopf A, Håkansson C, Inzunza J, Gustafsson JÅ, van der Saag PT, Carlsten H, Pettersson K, Ohlsson C, 2007. Identification of Target Cells for the Genomic Effects of Estrogens in Bone. *Endocrinology.* 148:5688-5695.
- Winnay JN, Hammer GD, 2006. Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 20:147-166.
- Witt W, Kolleck I, Fechner H, Sinha P, Rustow B, 2000. Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells. *J Lipid Res.* 41:2009-2016.
- Won EY, Yoon MK, Kim SW, Jung Y, Bae HW, Lee D, Park SG, Lee CH, Hwang GS, Chi SW, 2013. Gender-specific metabolomic profiling of obesity in leptin-deficient ob/ob mice by 1H NMR spectroscopy. *Plos one.* 8:e75998.
- Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE, 2010. ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endocrinol.* 45:59-68.

- Xu S, Laccotripe M, Huang X, Rigotti A, Zannis VI, Krieger M, 1997. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective uptake. *J Lipid Res.* 38:1289-1298.
- Xu J, Qian J, Xie X, Lin L, Ma J, Huang Z, Fu M, et Zu Y, Ge J, 2012a. High density lipoprotein cholesterol promotes the proliferation of bone-derived mesenchymal stem cells via binding scavenger receptor-B type I and activation of PI3K/Akt, MAPK/ERK1/2 pathways. *Mol Cell Biochem.* 371:55-64.
- Xu J, Qian J, Xie X, Lin L, Zou Y, Fu M, Huang Z, Zhang G, Su Y, Ge J, 2012b. High Density Lipoprotein Protects Mesenchymal Stem Cells from Oxidative Stress-Induced Apoptosis via Activation of the PI3K/Akt Pathway and Suppression of Reactive Oxygen Species. *Int J Mol Sci.* 13:17104-17120.
- Xu M, Zhou H, Gu Q, Li C, 2009. The expression of ATP-binding cassette transporters in hypertensive patients. *Hypertension res.* 32:455-461.
- Xue Y, Karaplis AC, Hendy GN, Goltzman D, Miao D, 2006. Exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 exerts a skeletal anabolic effect and improves mineral ion homeostasis in mice that are homozygous for both the 1 α -hydroxylase and parathyroid hormone null alleles. *Endocrinology.* 147:4801-4810.
- Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Chihara K, 2002. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. *Endocrine J.* 49:211-217.
- Yamamoto H, Komekado H, Kikuchi A, 2006. Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell.* 11:213-223.
- Yang Z, Zhu T, Ma G, Yin H, Qian W, Zhang F, Cao K, Ma W, 2001. Apolipoprotein E polymorphism in the early onset of coronary heart disease. *Chin Med J (Engl).* 114:983-995.
- Ye ZJ, Go GW, Singh R, Liu W, Keramati AR, Mani A, 2012. LRP6 protein regulates low density lipoprotein (LDL) receptor-mediated LDL uptake. *J Biol Chem.* 287:1335-1344.
- Yezereska I, Hernandez Hernandez J, Olmos Martinez J, Gonzalez Macias J, 2011. Dyslipidemia and bone metabolism. A common bond of the osteoporosis and the atherosclerosis ? *Rev Osteoporos Metab Miner.* 3:41-50.

- Yu BL, Zhao SP, Hu JR, 2010. Cholesterol imbalance in adipocytes: a possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity. *Obesity Rev.* 11:560-567.
- Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RGW, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW, 2001. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nature Med.* 7:853-857.
- Yvan-Charvet L, Bobard A, Bossard P, Massiéra F, Rousset X, Ailhaud G, Teboul M, Ferré P, Dagher G, Quignard-Boulangé A, 2007. *In vivo* evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1340-1345.
- Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, Welch CL, Wang N, Randolph GJ, Snoeck HW, Tall AR, 2010. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science.* 328:1689-1693.
- Zaidi M, Sun L, Robinson LJ, Tourkova IL, Liu L, Wang Y, Zhu LL, Liu X, Li J, Peng Y, Yang G, Shi X, Levine A, Iqbal J, Yaroslavskiy BB, Isales C, Blair HC, 2010. ACTH protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of bone. *Proc Nat Acad Sci.* 107:8782-8787.
- Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ, 2005a. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. *J Clin Invest.* 115:2870-2874.
- Zhang X, Shen P, Coleman M, Zou W, Loggie BW, Smith LM, Wang Z, 2005b. Caveolin-1 down-regulation activates estrogen receptor alpha expression and leads to 17 β -estradiol-stimulated mammary tumorigenesis. *Anticancer Res.* 25:369-376.
- Zhang Y, Ahmed AM, McFarlane N, Capone C, Boreham DR, Truant R, Igdoura SA, Trigatti BL, 2007. Regulation of SR-BI-mediated selective lipid uptake in Chinese hamster ovary-derived cells by protein kinase signaling pathways. *J Lipid Res.* 48:405-416.
- Zhang C, Cho K, Huang Y, Lyons JP, Zhou X, Sinha K, McCrea PD, de Crombrughe B, 2008. Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proc Natl Acad Sci.* 105:6936-6941.
- Zhang Y, McGillicuddy FC, Hinkle CC, O'Neill S, Glick JM, Rothblat GH, Reilly MP, 2010. Adipocyte modulation of high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation.* 121:1347-1355.

- Zhang C, Tang W, Li Y, Yang F, Dowd DR, MacDonald PN, 2011. Osteoblast-specific transcription factor osterix increases vitamin D receptor gene expression in osteoblasts. *PLoS ONE*. 6:e26504.
- Zhang C, 2012a. Molecular mechanisms of osteoblast-specific transcription factor Osterix effect on bone formation. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 44:659-665.
- Zhang J, Zhang X, Zhang L, Zhou F, van Dinther M, Ten Dijke P, 2012b. LRP8 mediates Wnt/ β -catenin signaling and controls osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 27:2065-2074.
- Zhang F, Wen Y, Guo X, 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*. Apr. 7 (E-pub ahead of print).
- Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL, 2004. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 114:529-541.
- Zhong Q, Sridhar S, Ruan L, Ding KH, Xie D, Insogna K, Kang B, Xu J, Bollag RJ, Isales CM, 2005. Multiple melanocortin receptors are expressed in bone cells. *Bone*. 36:820-831.
- Zhou Z, Neupane M, Zhou HR, Wu D, Chang CC, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ, 2012. Leptin differentially regulate STAT3 activation in ob/ob mouse adipose mesenchymal stem cells. *Nutr Metab (Lond)*. 9:109.
- Zhu W, Smart EJ, 2005. Myristic acid stimulates endothelial nitric-oxide synthase in a CD36- and an AMP kinase-dependent manner. *J Biol Chem*. 280:29543-29550.